

Aus dem Institut für Molekulare Onkologie
Direktor: Prof. Dr. Thorsten Stiewe
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Mutagenese des endogenen *TP53*-Lokus durch
CRISPR/Cas9-vermittelte homologe
Rekombination & Base Editing in
Lungenkarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Daniel Drangenstein
aus Kassel
Marburg 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 27.06.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner
Referent: Herr Prof. Dr. T. Stiewe
Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Müller

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
1.1. Krebserkrankungen	3
1.1.1. Krebserkrankungen allgemein	3
1.1.2. Das Bronchialkarzinom	3
1.2. Die molekularbiologische Entstehung von Krebs	6
1.3. Die Auswirkung einer p53-Mutation auf Tumore	9
1.4. Die Methoden der Genomeditierung	14
1.4.1. Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	14
1.4.2. CRISPR/Cas9	15
1.4.3. Base Editing	18
1.5. Ziele des Projekts	21
1.5.1. Die Generierung von H460 ^{Δ/Δ/LSL} <i>PuroS</i> Zellen	21
1.5.2. Mutagenese von Exon 8 durch den <i>Base Editor</i>	22
2. Material	23
2.1. Zelllinien	23
2.2. Bakterien	23
2.3. Viren	23
2.4. Antikörper	24
2.5. Enzyme und Enzympuffer	24
2.6. Plasmide	25
2.7. Oligonukleotide	26
2.8. Chemikalien und Reagenzien	29
2.9. Kits	31
2.10. Puffer	32
2.11. Verbrauchsmaterialien	33
2.12. Laborgeräte	34
2.13. Software	36
3. Methoden	37
3.1. Methoden in der Zellkultur	37
3.1.1. Inkubation und Kultivierung aller Zellen	37
3.1.2. Passagieren der Zellen und Ernten von Zellen	37
3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen	38
3.1.4. Bestimmung der Zellzahl	38
3.1.5. Generierung von Einzelzellklonen durch Grenzverdünnung	39
3.1.6. Transfektion unter Verwendung von Lipofectamine® 2000	39
3.1.7. Knockdown von p53 durch siRNA-Transfektion	40
3.1.8. Adenovirale Infektion	41

3.1.9.	Kolonieformationstest (CFA)	41
3.1.10.	Durchflusszytometrie (FACS)	42
3.2.	Molekularbiologische Methoden	43
3.2.1.	Isolation von genomischer DNA	43
3.2.2.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	43
3.2.3.	Agarose-Gelelektrophorese	47
3.2.4.	Digitale PCR	48
3.2.5.	Totale RNA-Isolation	49
3.2.6.	Generierung von cDNA	49
3.2.7.	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	50
3.2.8.	Golden-Gate-Klonierung	50
3.2.9.	Elektrotransformation von Bakterien	51
3.2.10.	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)	52
3.2.11.	Präparation von Plasmid-DNA in mittlerem Maßstab (Midi-Präp)	52
3.2.12.	Kontrollverdau von Plasmid-DNA	53
3.2.13.	TOPO-Klonierung	53
3.2.14.	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	54
3.2.15.	Sanger-Sequenzierung	54
3.2.16.	Next Generation Sequencing	54
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	55
3.3.1.	Generierung von Protein-Lysaten	55
3.3.2.	Messung der Proteinkonzentration	55
3.3.3.	Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.3.4.	Blotting der aufgetragenen Proteine	56
3.3.5.	Auswertung per Immundetektion	56
4.	Ergebnisse	58
4.1.	Die erfolgreiche Etablierung von H460-Zellen mit zwei <i>TP53-Knockout</i> -Allelen und einem editierbaren LSL-Allel durch CRISPR/Cas9 und homologe Rekombination	58
4.1.1.	Erfolgreiche Generierung des Donor-Vektors für CRISPR/Cas9 und homologe Rekombination	58
4.1.2.	Generierte Einzelzellklone zeigen den Einbau von exakt einer LSL-Kassette im <i>TP53</i> -Lokus	60
4.1.3.	Zwei Deletionen auf den beiden anderen Allelen neben dem LSL-Allel der H460-Zellen bewirken ein <i>TP53-Knockout</i>	64
4.1.4.	H460 ^{Δ/Δ/LSL} -Zellen zeigen eine Induzierbarkeit der WTp53-Expression nach AdenoCre-Infektion	68
4.1.5.	Die erfolgreiche Generierung Puromycin-sensitiver H460 ^{Δ/Δ/LSL} -Einzelzellklone legt den Grundstein für spätere Mutagenese	71
4.2.	Die erfolgreiche Mutagenese des R175-Lokus in den etablierten H460 ^{Δ/Δ/LSL} -Zellen durch CRISPR/Cas9 und HDR	74
4.2.1.	Einbau von Mutationen durch CRISPR/Cas9 und HDR resultiert in H460 ^{Δ/Δ/+} Zellen mit mut-p53-Expression	74
4.2.2.	Die saturierte Mutagenese des R175-Codons der H460 ^{Δ/Δ/LSL} #B4.1-Zellen zeigt die Verwendungsmöglichkeit dieser Zellklone für Hochdurchsatzmutagenese	81
4.3.	Erfolgreiche Etablierung einer effizienten Mutagenese von <i>TP53</i> durch <i>Base Editing</i> in H460 und HCT116-Zellen	89

4.3.1.	Erste Versuche mit R273C-induzierenden sgRNAs zeigen eine sehr hohe Effizienz des <i>Base Editors</i> , Basentransitionen zu induzieren	89
4.3.2.	Die erfolgreiche Generierung und Anwendung des <i>Base Editors</i> mit 27 sgRNAs an Exon 8 von <i>TP53</i>	95
5.	Diskussion	103
5.1.	Die erfolgreiche Etablierung einer H460 ^{Δ/Δ/LSL} <i>PuroS</i> – Zelllinie mit anschließender Mutagenese des R175-Codons	103
5.1.1.	Der Einbau der LSL-Kassette in parentale H460-Zellen durch CRISPR/Cas9 und HDR ist gelungen	103
5.1.2.	Die Rekombinationseffizienz bei AdenoCre-Infektion wird durch Optimierung der Methodik deutlich gesteigert	107
5.1.3.	Die bekannte Ineffizienz von CRISPR/Cas9 und HDR bei Einbau großer Donor-DNA-Sequenzen zeigt sich auch in diesem Projekt	108
5.1.4.	Die Mutagenese des R175-Lokus der generierten Zelllinie ist erfolgreich, bietet jedoch Potenzial zur Optimierung	111
5.2.	Die Mutagenese von <i>TP53</i> Exon 8 durch <i>Base Editing</i> in H460 und HCT116-Zellen zeigt sehr hohe Effizienz	114
5.2.1.	Für die Mutagenese des R273-Codons wird eine hohe Spezifität und Vorhersehbarkeit beobachtet	114
5.2.2.	Die Analyse des Editierungsmusters des <i>Base Editors</i> gibt Einblicke in Präferenzen der benachbarten Nukleotide des zu editierenden Cytosins	116
6.	Fazit und Ausblick	120
7.	Literaturverzeichnis	XII
8.	Anhang	XXIX
	Supplementäre Abbildungen	XXIX
	Lebenslauf	XXXV
	Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer	XXXVI
	Danksagung	XXXVII
	Ehrenwörtliche Erklärung	XXXVIII

Abkürzungsverzeichnis

	Abkürzung	Bedeutung
	%	Prozent
	°C	Grad Celsius
	α	Anti, Alpha
	Δ	Delta
	μ	Mikro
A	AdCre/AdenoCre	Adenovirus mit Cre-Rekombinase
	APOBEC	Desaminase (<i>Apolipoprotein B editing catalytic polypeptide</i>)
	ATM	Ataxie Telangiektasie mutiert
B	BE	<i>Base Editing</i>
	BGH	Bovine Wachstumsfaktoren (<i>bovine growth hormones</i>)
	bp	Basenpaar(e)
	bzw.	beziehungsweise
C	C>T	Cytosin zu Thymin Transition
	Cas9	CRISPR-assoziiert
	<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
	cDNA	Komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
	CFA	Kolonieformationstest (<i>colony formation assay</i>)
	Chk1/2	Checkpoint Kinase
	CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
	crRNA	CRISPR RNA
	Ct	Schwellenwertzyklus (<i>cycle threshold</i>)
	CTD	Carboxy-terminale Domäne
D	Da	Dalton, atomare Masseneinheit
	DBD	DNA-bindende Domäne
	dCas9	Defiziente (<i>dead</i>) Cas9
	DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle</i> Medium
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
	DNE	Dominant-negativer Effekt
	dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat

	DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
E	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	et al.	<i>et alia</i> (Latein), und andere
	EZK	Einzelzellklon
F	FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
	FBS	Fetales bovines Serum
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
G	g	Gramm
	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
	gDNA	genomische DNA
	GFP	grün-fluoreszierendes Protein
	GOF	Funktionsgewinn (<i>gain-of-function</i>)
H	h	Stunde (<i>hour</i>)
	HA	Homologie-Arm
	hA3A	Humane APOBEC3A
	HDR	Homologe Reparatur (<i>homology directed repair</i>)
	HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
I	IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
	ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>)
	ICE	<i>Inference of CRISPR Edits</i>
	<i>indel</i>	Insertion/Deletion
K	k	Kilo
L	l	Liter
	LOF	Funktionsverlust (<i>loss-of-function</i>)
	LSL	LoxP- (EF1 α -Puromycin-N-Acetyltransferase-T2A-GFP)-Stopp-LoxP
	<i>Luc</i>	Luciferase
M	m	Milli / Meter

	M	Molar
	<i>mdm2</i>	<i>Mouse double minute</i>
	min	Minute
	MMEJ	Mikrohomologie-vermittelte End-zu-End Verknüpfung (<i>microhomology-mediated end joining</i>)
	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
	mRNA	Boten (<i>messenger</i>) RNA
	mut-p53	Mutiertes p53
N	N3a	Nutlin-3a
	nCas9	Cas9 Nickase
	NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
	NHEJ	nicht-homologe End-zu-End Verknüpfung (<i>non-homologous end joining</i>)
	NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
	nsi	nicht-spezifische (<i>non-targeting</i>) siRNA Kontrolle
P	<i>pac</i>	Gen codierend für Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC)
	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
	PAM	<i>Protospacer-adjacent motif</i>
	PBND	PCR-Puffer mit nichtionischen Detergenzien
	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
	pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
	PRIMA-1	<i>p53 reactivation and induction of massive apoptosis</i>
	PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
R	RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
	ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies (<i>reactive oxygen species</i>)
	rpm	Runden pro Minute
	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
	rRC	<i>Relative Read Counts</i>
	RT	Raumtemperatur
	RT-qPCR	Reverse Transkription - quantitative PCR
S	s	Sekunde
	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
	sgRNA	<i>single guide RNA</i>

	siRNA	<i>small interfering</i> RNA
	SNP	Variation einzelner Basenpaare (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
	SSC	Seitenstreulicht (<i>side scatter</i>)
T	TAD	Transaktivierungs-Domäne
	TAE	Trisacetat-EDTA
	TD	Tetramerisierungs-Domäne
	<i>TP53</i>	Tumorprotein 53
	tracrRNA	Transaktivierende CRISPR RNA
	TSS	Transkription Start Sequenz
U	UGI	Uracil-DNA-Glykosylase-Inhibitor
V	V	Volt
	v/v	Volumen pro Volumen
W	w/v	Gewicht pro Volumen
	WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Bronchialkarzinoms in Deutschland. _____	4
Abbildung 2: Aktivierungskaskade von p53. _____	7
Abbildung 3: Aktivierung zellulärer Prozesse durch p53-Induktion. _____	8
Abbildung 4: Am häufigsten mutierte Gene in Tumoren und spezifisch in Lungenkrebs. _____	10
Abbildung 5: Mutationsmuster von <i>TP53</i> und im Vergleich mit anderen Tumorsuppressoren und Onkogenen. _____	12
Abbildung 6: Verteilung der am häufigsten mutierten Codons von <i>TP53</i> in menschlichen Tumoren. _____	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der drei Haupt-Reparaturmechanismen einer Zelle nach Doppelstrangbruch. _____	15
Abbildung 8: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Systems. _____	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung des <i>Base Editors</i> . _____	18
Abbildung 10: Mutationstypen in <i>TP53</i> und Desaminierung des <i>Base Editors</i> . _____	19
Abbildung 11: Generierung des Donor-Vektors HR700-PA- HA1_S+HA2_L_GoldenGate_insT_WT. _____	59
Abbildung 12: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-vermittelten Einbaus einer Homologiesequenz zusätzlicher LSL-Kassette auf ein bestehendes Allel. _____	60
Abbildung 13: Generierte Einzelzellklone zeigten den Einbau von einer LSL-Kassette an der richtigen Stelle von <i>TP53</i> . _____	62
Abbildung 14: FACS und dPCR bestätigen, dass die LSL-Kassette einmalig im Genom eingebaut wurde. _____	63
Abbildung 15: Charakterisierung der beiden <i>TP53-Knockout</i> -Allele der H460-Zellklone mittels PCR und ICE-Analyse. _____	65
Abbildung 16: Darstellung der generierten Deletionen der beiden <i>TP53-Knockout</i> - Allele durch TOPO-Klonierung. _____	67
Abbildung 17: Rekombination der H460 ^{Δ/Δ/LSL} -Zellen nach AdenoCre-Infektion wurde via FACS dargestellt. _____	69
Abbildung 18: Im Western Blot zeigten H460 ^{Δ/Δ/LSL} -Zellen eine Induzierbarkeit der p53-Expression nach AdenoCre-Infektion. _____	70
Abbildung 19: Validierung der erfolgreichen Generierung Puromycin-sensitiver H460 ^{Δ/Δ/LSL} - Zellklone durch Sanger-Sequenzierung und FACS. _____	72
Abbildung 20: Kolonieformationstest beider Puromycin-sensitiver Einzelzellklone. _____	73

Abbildung 21: Schema der R175-Mutagenese durch CRISPR/Cas9-vermittelte HDR.	74
Abbildung 22: Darstellung des LSL-Allels nach Transfektion durch geschachtelte PCR.	75
Abbildung 23: Sanger Sequenzierung zeigte effizienten Einbau der R175-Vektoren auf DNA-Ebene.	76
Abbildung 24: Durchflusszytometrie der R175-Mutanten 14 Tage nach AdenoCre-Infektion zeigte gewünschte GFP-Negativität nach Rekombination.	77
Abbildung 25: Nach AdenoCre-Infektion zeigte sich aktive Expression der entsprechenden p53-R175-Mutante vom endogenen Lokus.	79
Abbildung 26: Quantitative PCR von <i>CDKN1A</i> in #B4.1 R175-Mutanten.	80
Abbildung 27: Schematische Darstellung des Saturierte-Mutagenese-Experiments.	81
Abbildung 28: Durchflusszytometrie für GFP der R175-Library vor AdenoCre-Infektion und 7 bzw. 14 Tage nach AdenoCre-Infektion.	82
Abbildung 29: Erfolgreiche Vorbereitung der Proben für <i>Next Generation Sequencing</i> via geschachtelter PCR.	84
Abbildung 30: Korrelation der R175-Library-Replikate und gegenüber der Vektor-Library im <i>Next Generation Sequencing</i> .	86
Abbildung 31: Berechnete Relative Fitness Scores der R175-Library als Heatmap.	88
Abbildung 32: Kolonieformationstest nach initialer <i>Base Editor</i> Transfektion.	89
Abbildung 33: Schema der durchgeführten geschachtelten PCRs zur Darstellung von Exon 8.	90
Abbildung 34: Sanger-Sequenzierung der polyklonalen Zellpools nach DMSO- bzw. Nutlin-3a-Behandlung zeigte eine sehr hohe Effizienz des <i>Base Editors</i> .	92
Abbildung 35: PCR zur spezifischen Darstellung des R273-Codons in <i>Base Editor</i> -transfizierten Einzelzellklonen.	93
Abbildung 36: Western Blot zeigte Stabilisierung der exprimierten p53-Mutante in R273C-mutierten Einzelzellklonen.	94
Abbildung 37: Überblick aller 27 verwendeten sgRNAs des <i>Base Editor</i> -Experiments.	95
Abbildung 38: Schema der Generierung der Vektoren pGL3_U6_sgRNA_PGK_puromycin_1-27 durch GoldenGate-Klonierung.	96
Abbildung 39: Kolonieformationstest der 26 sgRNAs nach Kotransfektion mit dem <i>Base Editor</i> .	97
Abbildung 40: Analyse der gDNA Nutlin-resistenter Zellen nach Transfektion durch spezifischer geschachtelter PCR.	98

Abbildung 41: Prozentuale Abbildung aller Cytosin-Basen (C) im Editierungsfenster von Base 1-12 bei Betrachtung der Base vor bzw. nach dem C. _____	101
Abbildung 42: TOPO-Klonierung der mit sgRNA#16 und <i>Base Editor</i> transfizierten Zellen. _____	102

Supplementäre Abbildungen:

Suppl. Abbildung I: Durchflusszytometrie der jeweiligen Einzelzellklone vor Transfektion und nach Transfektion mit dem jeweiligen Mutationstragenden Vektor. _____	XXIX
Suppl. Abbildung II: Sanger-Sequenzierung von cDNA der Einzelzellklone nach AdenoCre-Infektion. _____	XXIX
Suppl. Abbildung III: NGS-Auswertung der R175-Library. _____	XXX
Suppl. Abbildung IV: Nachweis der R273C-Mutation in allen Einzelzellklonen. _____	XXXI
Suppl. Abbildung V: siRNA- <i>Knockdown</i> von H460 R273C-Einzelzellklon _____	XXXII
Suppl. Abbildung VI: Validierung der Klonierung von pGL3_U6_sgRNA_PGK_puromycin_1-27 durch Restriktionsverdau. _____	XXXII
Suppl. Abbildung VII: Validierung der Klonierung von pGL3_U6_sgRNA_PGK_puromycin_1-27 durch Sequenzierung. _____	XXXIII
Suppl. Abbildung VIII: Mutationsanalyse Nutlin-resistenter Zellen nach Transfektion des <i>Base Editors</i> und sgRNA#1-27. _____	XXXIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	23
Tabelle 2: Bakterien	23
Tabelle 3: Viren	23
Tabelle 4: Primäre Antikörper	24
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper	24
Tabelle 6: Enzyme und Enzypuffer	24
Tabelle 7: Plasmide	25
Tabelle 8: Primer	26
Tabelle 9: sgRNAs	27
Tabelle 10: siRNAs	28
Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien	29
Tabelle 12: Kits	31
Tabelle 13: Puffer	32
Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 15: Laborgeräte	34
Tabelle 16: Software	36
Tabelle 17: Übersicht aller beobachteten Mutationen nach Analyse der gDNA der 26 Nutlin-resistenten polyklonalen Zellpools nach <i>Base Editor</i> -Transfektion durch Sanger- Sequenzierung.	100

Zusammenfassung

Das Bronchialkarzinom ist eine der häufigsten Tumorarten und der führende Grund Krebs-assoziiertes Sterbefälle weltweit. In bis zu 70 % aller Bronchialkarzinome liegt das Tumorsuppressorgen *TP53* mutiert vor. Ein besseres Verständnis des Genprodukts p53 und dessen Mutanten ist somit ein essenzieller Schritt zur Verbesserung der Prognose von Patienten und dadurch Teil intensiver Forschung.

Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit über mehrere Schritte ein Zellklon der Bronchialkarzinom-Zelllinie NCI-H460 (H460) generiert, an dem zukünftig eine effiziente Mutagenese des endogenen *TP53*-Lokus durch CRISPR/Cas9 und homologe Rekombination (*homology directed repair*, HDR) durchgeführt werden kann. Zunächst wurde mit dieser Methodik eine zusätzliche Sequenz, eine sogenannte LSL (LoxP-Stop-LoxP) - Kasette, in ein *TP53*-Allel eingebaut. Die anderen beiden *TP53*-Allele wurden ausgeschaltet, sodass eine monoallelische *TP53*-Expression erreicht wurde. Das Allel mit der LSL-Kasette konnte anschließend effizient editiert werden und das Verhalten einzelner *TP53*-Mutanten sowie eine saturierte Mutagenese des *hotspot*-Codons R175 wurden observiert. Hierfür wurde die zelluläre Fitness der Mutanten unter Behandlung mit dem Mdm2-Inhibitor Nutlin-3a, der physiologisch die p53-Antwort aktiviert, observiert. Mithilfe dieses Zellklons kann so in zukünftigen Experimenten erstmals das Verhalten jeder einzelnen klinisch auftretenden Mutation von p53 auf physiologischem Expressionslevel und innerhalb einer physiologischen Genstruktur analysiert werden. Durch diese vollständige Charakterisierung können schlussendlich Therapieschemata optimiert werden, um jedem Patienten unter Berücksichtigung der individuell auftretenden *TP53*-Mutation eine geeignete Therapie zu ermöglichen.

Des Weiteren wurde eine Mutagenese von *TP53* durch die Verwendung eines *Base Editors* durchgeführt. Dieser besteht aus einer Cas9-Nickase, die mit einer APOBEC3A-Desaminase verknüpft ist. Damit konnten gezielt und mit einer Effizienz von über 90 % Cytosin-zu-Thymin Transitionen erreicht werden. In dieser Arbeit wurde zunächst das *hotspot*-Codon R273 von *TP53* in H460- und HCT116-Zellen, einer Kolonkarzinom-Zelllinie, erfolgreich editiert. Zusätzlich wurde in HCT116-Zellen eine Mutagenese von Exon 8 von *TP53* durchgeführt, bei der jede verfügbare PAM-Sequenz in diesem Bereich durch eine entsprechende sgRNA als Ziel erfasst wurde. Insgesamt konnte mit dem *Base Editor* eine gezielte Genomeditionierung mit hoher Effizienz beobachtet werden.

Abstract

Lung cancer is one of the most common cancer types and the leading cause of cancer-related mortality worldwide. In approximately 70 % of all lung cancer cases, the tumor suppressor gene *TP53* is mutated. Therefore, a better understanding of p53 mutants is an essential step towards the improvement of patient prognosis. That is one reason why p53 is intensively studied.

In this project, a cell clone of the lung cancer cell line NCI-H460 (H460) was established in a series of steps. This allowed an efficient mutagenesis of the endogenous *TP53* locus of this cell clone via CRISPR/Cas9 and homology directed repair (HDR). Initially, a specific DNA-sequence, called LSL (LoxP-Stop-LoxP) - cassette, was introduced into one *TP53* allele. The other two *TP53*-alleles present in this cell line were knocked out permanently, resulting in monoallelic *TP53* expression. Thereafter, efficient editing of the endogenous *TP53* locus was possible, so a generation of single *TP53* mutants and a saturated mutagenesis of the hotspot codon R175 were implemented in this project. Cellular fitness of those generated mutants was then observed under treatment with the Mdm2-inhibitor Nutlin-3a, which specifically activates the p53 pathway under physiological circumstances. This cell clone is now suitable for introducing most clinically relevant *TP53* mutations and analyzing their impact at a physiological expression level and within its native gene structure. This characterization can be used to optimize therapeutic schemes by individually adjusting the treatment according to the p53 mutant present in a patient's tumor.

Furthermore, a mutagenesis of *TP53* was performed by using a base editor which consists of a Cas9 nickase connected to an APOBEC3A deaminase. This construct was able to induce cytosine-to-thymine transitions with efficiencies over 90 %. In this project, the hotspot codon R273 of *TP53* was successfully edited in H460- and colorectal HCT116 cells. Additionally, a mutagenesis of exon 8 of *TP53* was performed in HCT116 cells by exploiting every PAM sequence present and targeting it with an appropriate sgRNA. In general, the base editor showed high efficiency combined with very high specificity.

1. Einleitung

1.1. Krebserkrankungen

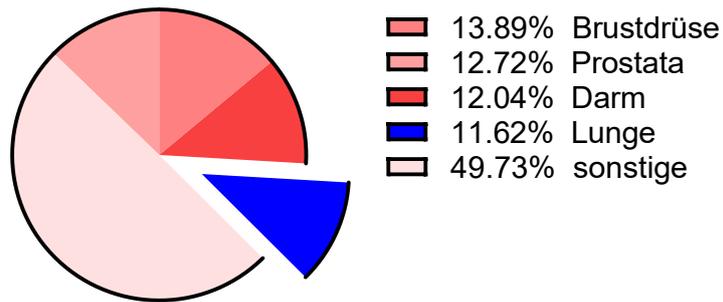
1.1.1. Krebserkrankungen allgemein

Als Krebserkrankung werden umgangssprachlich „alle bösartigen Neubildungen einschließlich der Lymphome und Leukämien“ bezeichnet (Robert-Koch-Institut 2016). Krebs geht aus einer Transformation von gesunden Zellen zu bösartigen Tumorzellen hervor (Weinberg 2014, S. 457). So entsteht ein Zellverband bösartiger Tumorzellen, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er ungehindert wachsen kann und so in umliegendes Gewebe infiltrieren kann (Rassow et al. 2016, S. 539). Krebs war in Deutschland 2019 die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems mit circa 230.000 Todesfällen (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2020). Insgesamt konnten so fast ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland auf Krebserkrankungen zurückgeführt werden (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2020). Obwohl durch verbesserte Therapie- und Diagnostikoptionen die Gesamtmortalität von Krebserkrankungen verringert werden konnte (Hashim et al. 2016), nimmt die absolute Anzahl an Neuerkrankungen durch den demographischen Wandel weiter zu (Robert-Koch-Institut 2016). Prognosen zufolge soll so die Anzahl an Neuerkrankungen bis 2040 um etwa 40 % zunehmen (American Cancer Society 2020).

1.1.2. Das Bronchialkarzinom

Bösartige Neubildungen der Lunge (Bronchialkarzinom) waren 2017 in Deutschland die zweithäufigste Krebserkrankung bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen (Zentrum Für Krebsregisterdaten (ZfKD) Im Robert Koch-Institut 2020). So sind 11,6 % aller diagnostizierten bösartigen Neubildungen Lungenkarzinome (Abbildung 1 A) (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019). Hierbei stieg die Inzidenz bei Frauen in den letzten Jahren, während die der Männer zurückging (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019). Da als Risikofaktor das Rauchen eine hauptsächliche Rolle spielt, ist dieser Wandel vor allem auf die veränderten Rauchgewohnheiten von Männern und Frauen zurückzuführen (Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) 2008). Das Bronchialkarzinom war 2019 in Deutschland für circa 22 % bei Männern und 16 % bei Frauen aller Krebssterbefälle verantwortlich (Abbildung 1 B) (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2020).

A



B

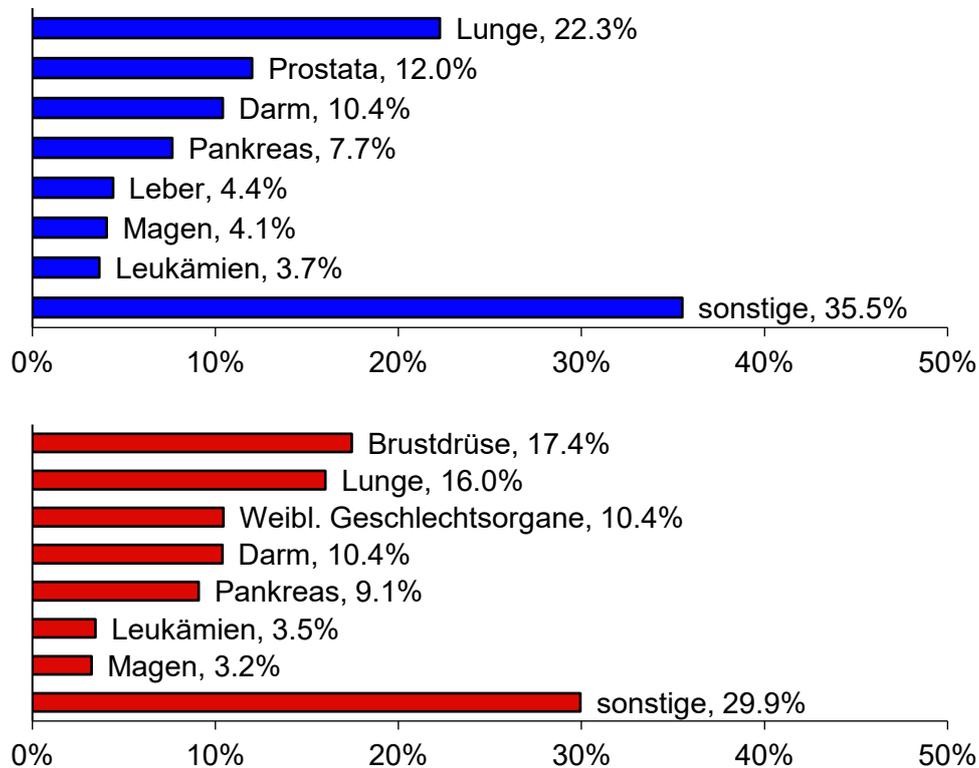


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Bronchialkarzinoms in Deutschland.

A: Inzidenz der häufigsten Krebsarten in Deutschland 2017. Basierend auf: Robert-Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019), Statistisches Bundesamt (Destatis) (2020).

B: Auflistung der prozentual häufigsten Tumorlokalisationen an den Gesamt-Krebssterbefällen in Deutschland 2019. Aufteilung nach Männern (blau, oben) und Frauen (rot, unten).

Basierend auf: Robert-Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019), Statistisches Bundesamt (Destatis) (2020).

Auch weltweit fallen mit 18,4 % der Großteil aller Krebssterbefälle auf das Bronchialkarzinom zurück (Jemal et al. 2011). Mit einer 5-Jahre-Überlebensrate von 15 % bei Männern und 21 % bei Frauen gehört das Bronchialkarzinom zu einer der prognostisch ungünstigsten Tumorarten (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019). Das liegt unter anderem daran, dass Symptome unspezifisch sind, etwa Husten oder Dyspnoe, oder erst bei sehr fortgeschrittener Erkrankung auftreten, z.B. Husten mit blutigem Auswurf (Hämoptysen) (Herold 2021, S. 403). Eine Früherkennung durch Computertomographie (CT) wird derzeit nur für spezifische Personengruppen, wie etwa Rauchern mit über 30 Packungsjahren empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF) 2018, S. 66; Manser et al. 2013).

Lungenkrebs kann zunächst in zwei große Gruppen eingeteilt werden, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC, *small cell lung cancer*) und dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC, *non-SCLC*) (Pschyrembel 2020). Mit etwa 80-85 % aller Lungenkrebs-Fälle ist hierbei das NSCLC deutlich häufiger und kann weiter unterteilt werden in die drei Haupttypen Adenokarzinom (40 %), Plattenepithelkarzinom (35 %) und großzelligem Lungenkarzinom (10 %) (Herold 2021, S. 402). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit NCI-H460-Zellen gearbeitet, welche in die Untergruppe der großzelligen NSCLC-Zellen einzuordnen sind (Takahashi et al. 1989).

Diagnostisch wird die Verdachtsdiagnose eines Bronchialkarzinoms mithilfe von bildgebenden Verfahren, CT oder Magnetresonanz-Tomographie (MRT) mit anschließender Biopsie durch Bronchoskopie gesichert (Herold 2021, S. 404–405). Das genaue therapeutische Prozedere ist recht komplex. Bei einem noch nicht-metastasierten Tumor wird dieser nach Möglichkeit operativ entfernt, mit der Option der neoadjuvanten Behandlung (Eberhardt et al. 1999). Es sind jedoch zwei Drittel der Patienten bereits bei Diagnosestellung inoperabel (Herold 2021, S. 406). Anschließend erfolgt in der Regel eine (adjuvante) Chemotherapie, die auf Cisplatin und einem weiteren Medikament wie etwa Vinorelbin basiert (Pignon et al. 2006; Douillard et al. 2006; Arriagada et al. 2004). Zusätzlich können abhängig vom Mutations- und Rezeptorstatus des Tumors noch Medikamente bei EGFR-Mutationen (Wu et al. 2014), ALK-Translokationen (Solomon et al. 2014) oder gegen PD-L1 Rezeptoren (Antonia et al. 2017) eingesetzt werden.

1.2. Die molekularbiologische Entstehung von Krebs

Die Entstehung bösartiger Tumorzellen ist meist ein Prozess, der sich über viele Jahre erstreckt (Weinberg 2014, S. 440). Dies geschieht in mehreren Schritten durch eine Serie von Mutationen von Genen, die die Proliferation einer Zelle regulieren oder für die DNA-Reparatur verantwortlich sind (Rassow et al. 2016, S. 539). Die Zellproliferation wird hauptsächlich durch zwei Gen-Gruppen reguliert, den Protoonkogenen und den Tumorsuppressorgenen (Weinberg 2014, S. 231). Die Produkte von Protoonkogenen sind meistens Teil von Zellproliferation-stimulierenden Signalkaskaden und vermitteln in gesunden Zellen so die Wirkung von Wachstumsfaktoren (Rassow et al. 2016, S. 540). Durch bestimmte Mutationen können Protoonkogene zu Onkogenen konvertieren, beispielsweise durch Mutationen, die zu einem konstitutiv aktivierten Protein führen (Lodish et al. 2013 Kap. 24) oder durch eine Steigerung der Genexpression infolge einer Translokation oder Genamplifikation (Weinberg 2014, S. 127).

Dagegen haben Tumorsuppressorgene physiologisch die Aufgabe, die Zelle vor exzessiver Proliferation zu schützen (Sherr 2004). Das wird meist durch aktives Eingreifen in den Zellzyklus oder Induktion von Apoptose erreicht (Weinberg 2014, S. 271). Zur Entstehung von Tumoren im Kontext von Tumorsuppressorgenen ist meist eine *loss-of-function* (Funktionsverlust, LOF) Veränderung beider Allele nötig (Rassow et al. 2016, S. 543). Dies wird beispielsweise durch eine Alleldeletion und inaktivierende Punktmutationen erreicht (Weinberg 2014, S. 239).

Eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene ist *TP53*, mit dem Genprodukt p53 (Baker et al. 1989). Klinisch zeigt sich die enorme Wichtigkeit von p53 unter anderem bei dem Li-Fraumeni-Syndrom, bei dem Patient:innen eine Keimbahnmutation im *TP53*-Gen tragen und so meist schon im Kindesalter Tumoren entwickeln (Malkin et al. 1990). In einer gesunden, wachsenden Zelle ist p53 nur in niedriger Konzentration vorhanden. Das wird hauptsächlich durch das Enzym Mdm2 (*Mouse double minute 2*) erreicht (Cahilly-Snyder et al. 1987). Mdm2 ubiquitiniert p53 und markiert es so zum proteasomalen Abbau (Kubbutat et al. 1997). Obwohl es noch weitere beteiligte Ubiquitin-Ligasen gibt, scheint Mdm2 essenziell für die Regulation von p53 zu sein (Jones et al. 1995). Therapeutisch kann dies genutzt werden, indem die p53-Bindungsstelle von Mdm2 durch ein Medikament, wie zum Beispiel Nutlin-3a, inhibiert wird und dadurch weniger p53 abgebaut wird (Vassilev et al. 2004). Nutlin-3a wurde auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um das Ausmaß des Funktionsverlusts einer p53-Mutante zu beurteilen.

Beim Auftreten zahlreicher Stressoren, die der Integrität der Zelle schaden können, wird p53 stabilisiert (Vousden und Prives 2009). Dazu gehören zum Beispiel DNA-Schäden, Hypoxie, erhöhte Expression von Onkogenen und replikativer Stress (Stiewe und Haran 2018) (Abbildung 2 A). Die Stabilisierung von p53 erfolgt unter anderem durch eine Phosphorylierung durch Kinasen wie die ATM-Kinase (Ataxie-Teleangiektasie-mutiert (Savitsky et al. 1995)), oder die ATR-Kinase (ATM-related) (Vogelstein et al. 2000), die zum Beispiel bei Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung aktiv werden (Banin et al. 1998) (Abbildung 2 B). Zusätzlich können Checkpoint-Kinasen 1 und 2 durch ATM/ATR aktiviert werden, die dann wiederum p53 phosphorylieren und stabilisieren (Bartek und Lukas 2003). Ein weiterer Weg der Stabilisierung von p53 ist die Acetylierung (Tang et al. 2008).

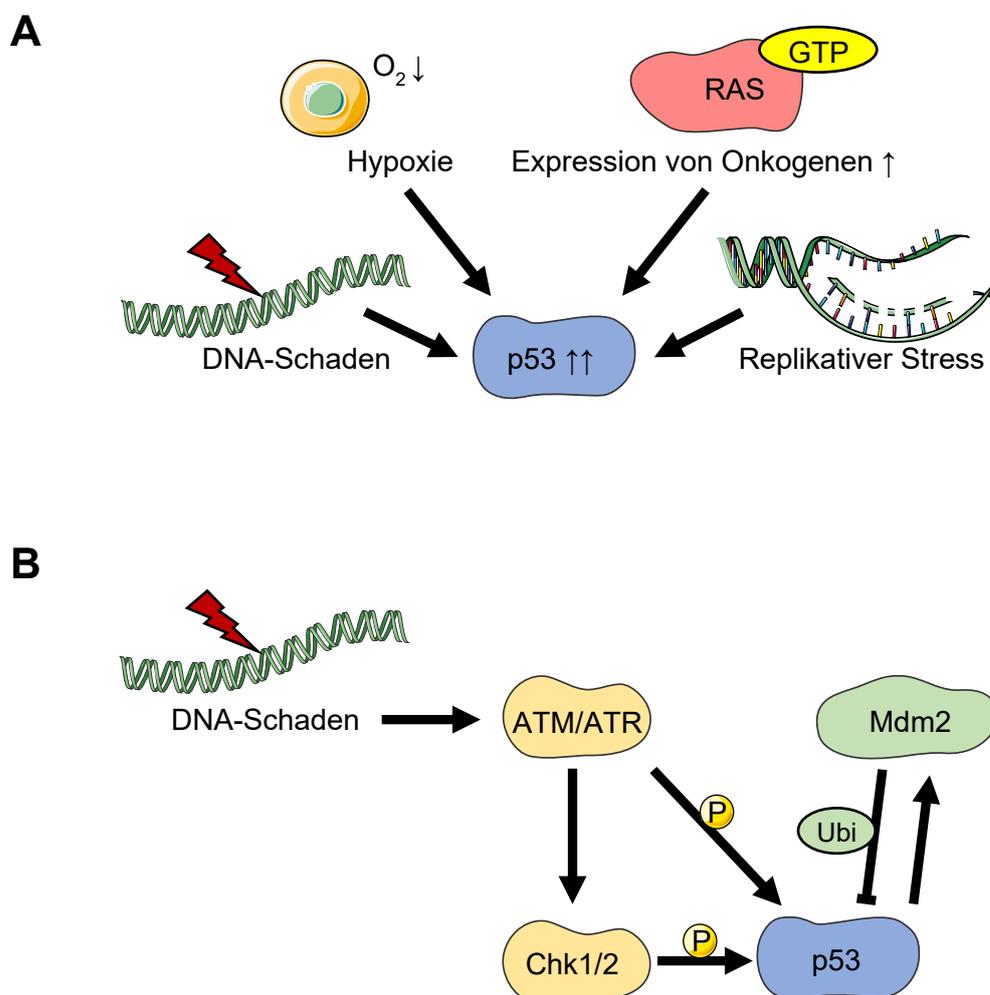


Abbildung 2: Aktivierungskaskade von p53.

A: Schematische Darstellung von Induktionsfaktoren für p53

B: Schematische Darstellung der Aktivierung von p53 nach DNA-Schäden

(basierend auf Biegging et al. 2014; Weinberg 2014, S. 339–347).

Sowohl Phosphorylierung als auch Acetylierung führen durch Mechanismen wie einer gestörten p53-Mdm2-Interaktion zur verstärkten p53-Aktivierung (Kruse und Gu 2009). Aktives p53 kann nun die Expression zahlreicher Gene stimulieren, die zu Zellzyklusarrest, Aktivierung der DNA-Reparatur oder Induktion von Seneszenz und Apoptose führen (Freed-Pastor und Prives 2012) (Abbildung 3). Darüber hinaus werden durch aktives p53 Prozesse wie die Invasion, Metastasierung oder metabolische Reprogrammierung von Zellen inhibiert (Biegging et al. 2014).

Ein essenzieller Effektor von p53 ist der CDK (Cyclin-*dependent*-Kinase) - Inhibitor p21, der nach Aktivierung zu einem Zellzyklusarrest führt (Gartel und Radhakrishnan 2005). Außerdem wichtig zu nennen sind die Gene *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und *BAX* (Bcl-2-assoziiertes X Protein), die von p53 hochreguliert werden und Apoptose induzieren können (Toshiyuki und Reed 1995; Nakano und Vousden 2001). Zusätzlich erfolgt eine Autoregulation von p53, indem es selbst die Expression von Mdm2 aktiviert und so einen negativen Feedback-Regelkreis einleitet (Harris und Levine 2005) (Abbildung 2 B).

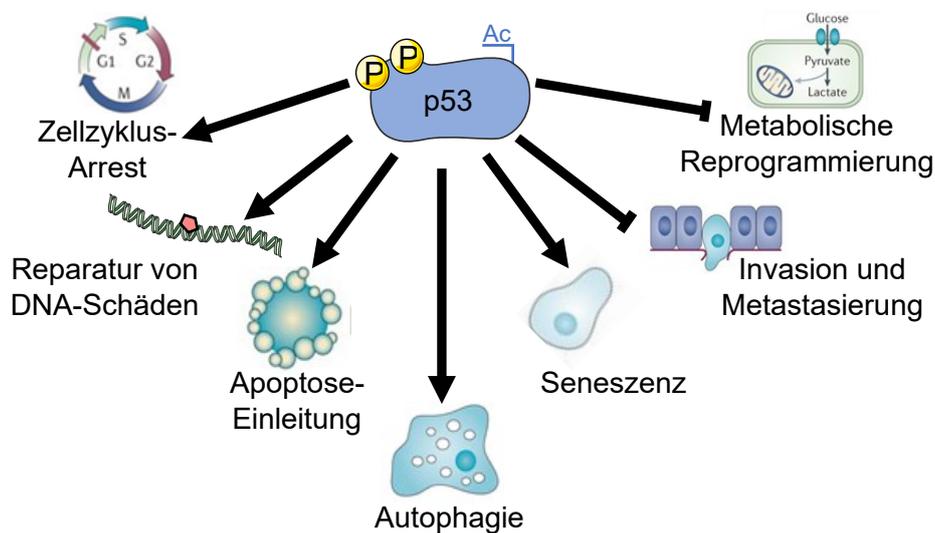


Abbildung 3: Aktivierung zellulärer Prozesse durch p53-Induktion.

(basierend auf Biegging et al. 2014; Weinberg 2014, S. 339–347).

1.3. Die Auswirkung einer p53-Mutation auf Tumore

TP53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren, es liegt in ca. 40 % aller Tumorerkrankungen mutiert vor (Kandoth et al. 2013; Freed-Pastor und Prives 2012) (Abbildung 4). Bei Bronchialkarzinomen ist *TP53* außerdem in über 70 % der Fälle mutiert (Grossman et al. 2016). Zudem wurde in einigen Tumorentitäten eine klinisch signifikant schlechtere Prognose bei Vorliegen einer p53-Mutation beobachtet (Ahrendt et al. 2003; Wang et al. 2017). Die in dieser Arbeit verwendeten H460-Zellen besitzen laut canSAR-Datenbank drei Wildtyp-*TP53*-Allele (Coker et al. 2019).

Das Verhalten von p53 wird durch eine Mutation oft in eine für einen Tumorsuppressor untypische Richtung verändert (Soussi und Wiman 2015). Das zeigt sich unter anderem schon dadurch, dass bei der Entdeckung von p53 dieses zunächst für ein Onkogen gehalten wurde (Eliyahu et al. 1984). Die meisten Tumorsuppressoren zeigen im Rahmen der Karzinogenese *nonsense*- oder *frameshift*-Mutationen, die durch vorzeitiges Stopp-Codon oder Leserasterverschiebung zum vollständigen Funktionsverlust führen (Tate et al. 2019).

Im Gegensatz dazu zeigt p53 in einem Großteil der Fälle *missense*-Mutationen, die circa 73 % aller Mutationen ausmachen (Bouaoun et al. 2016) (Abbildung 5 A). Hier findet ein Austausch einer Aminosäure statt, wodurch ein vollständig translatiertes, mutiertes Protein entsteht, was jedoch in der Funktion verändert ist (Weinberg 2014, S. 336). Ein hoher Anteil von *missense*-Mutationen ist typischerweise Onkogenen vorbehalten, wie z.B. *KRAS* oder *PIK3CA* (Soussi und Wiman 2015) (Abbildung 5 B).

Es gibt einige Aminosäuren von p53, die in Tumoren besonders häufig mutiert sind, auch *hotspot*-Mutationen genannt (Joerger und Fersht 2016). Die Mutationen in den sechs am häufigsten mutierten Aminosäuren R175, G245, R248, R249, R273 und R282 aufsummiert machen etwa 30 % aller p53-Mutationen aus (Bouaoun et al. 2016) (vgl. Abbildung 6). Des Weiteren nehmen allein die beiden in dieser Arbeit wichtigen Punktmutationen R175H und R273C fast 10 % aller p53-Mutationen ein (Bouaoun et al. 2016). Alle diese *hotspot*-Mutationen, wie auch der Großteil aller anderen *missense*-Mutationen von p53 sind in der DNA-bindenden-Domäne von p53 lokalisiert (Stiewe und Haran 2018) (Abbildung 6).

Insgesamt sind drei unterschiedliche Mutationstypen von p53 zu unterscheiden, die von der Wildtyp-Funktion der jeweils mutierten Aminosäure abhängen. Den ersten dieser drei Typen bilden die Kontaktmutanten, die z.B. die *hotspot*-Aminosäuren R248 und R273

betreffen (Bullock und Fersht 2001). Diese Aminosäuren sind an der direkten Bindung der DNA beteiligt, wodurch bei Mutation die Bindung von Zielpromotern beeinträchtigt ist (Freed-Pastor und Prives 2012). Zweitens, die strukturellen Mutanten, wozu die anderen 4 *hotspot*-Aminosäuren R175, G245, R249 und R282 gehören, vermindern bei Mutation die Stabilität der DNA-bindenden Domäne, was ebenfalls zu einer verminderten Funktion führt (Bullock und Fersht 2001). Als dritter Typ sind die Kooperativitätsmutationen zu nennen (Timofeev et al. 2013). Zur effizienten DNA-Bindung bilden vier p53-Moleküle ein Homotetramer (Kitayner et al. 2006). Zur Stabilisierung dieses Tetramers sind unter anderem die beiden Aminosäuren R180 und E181 notwendig (Kitayner et al. 2006). Bei Mutation einer dieser Aminosäuren ist die Tetramerbildung gestört, was ebenfalls zur gestörten Aktivierung von Zielgenen führen kann (Timofeev et al. 2013).

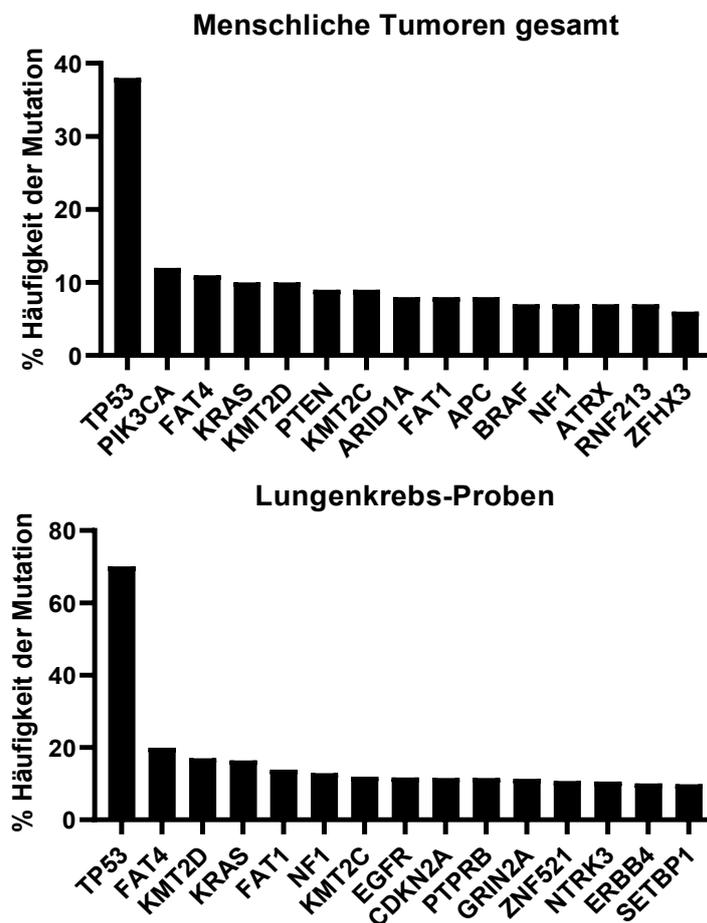


Abbildung 4: Am häufigsten mutierte Gene in Tumoren und spezifisch in Lungenkrebs.

Darstellung der *TP53*-Mutationshäufigkeit relativ zu anderen Genen insgesamt über alle menschlichen Tumorarten (n= 12538, links) und spezifisch in Lungenkrebs (n=1266, rechts).

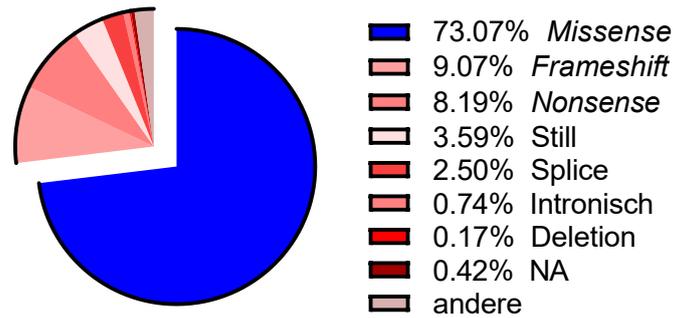
(basierend auf: Grossman et al. (2016)).

Diese *missense*-Mutationen wirken sich allgemein betrachtet in drei unterschiedlichen Arten und Weisen auf die Funktion von p53 aus. Zum einen kann ein Funktionsverlust von p53 (LOF) eintreten (Stiewe und Haran 2018). Dadurch kann p53 selbst nicht mehr regelrecht aktiviert werden oder durch p53 kann keine DNA von Zielgenen mehr gebunden und aktiviert werden, wodurch die Zellteilung nicht mehr adäquat reguliert wird (Kato et al. 2003; Donehower et al. 2019). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Hinweise für die Existenz einer *gain-of-function*-Komponente einiger p53-Mutanten, indem gezeigt wurde, dass Zellen mit mutiertem p53 eine höhere Malignität zeigen als Zellen ohne p53 (Lang et al. 2004; Bougeard et al. 2008; Dittmer et al. 1993). Dies führt zum Erlangen unterschiedlicher neuer Funktionen wie zum Beispiel eine Resistenz gegen Chemotherapie, erhöhte Invasion und Aggressivität von Tumorzellen oder eine Unterdrückung der Expression von proapoptotischen Genen (Zhang et al. 2020; Yue et al. 2017). Diese GOF-Komponente kann eine Erklärung für das dominante Auftreten von *missense*-Mutationen bei p53 sein, das, wie erwähnt, konträr zu den meisten anderen Tumorsuppressoren ist (Weinberg 2014, S. 336).

Außerdem kann ein sogenannter dominant-negativer Effekt (DNE) auftreten (Willis et al. 2004). Typischerweise agieren mutierte Tumorsuppressoren rezessiv, das bedeutet, dass es ausreicht, wenn nur eins der beiden Allele seine normale Funktion ausübt (Knudson 1971). Erst bei Deaktivierung beider Allele ist der Tumorsuppressor nicht mehr funktional und eine Tumorzelle kann z.B. von einer verstärkten Proliferationsfähigkeit profitieren (Weinberg 2014, S. 335). Als DNE wurde nun die Beobachtung terminiert, dass bei p53 bereits die Mutation eines Allels ausreicht, um Eigenschaften einer Tumorzelle zu zeigen, indem das verbleibende Wildtyp-p53 unterdrückt wird (Willis et al. 2004; Boettcher et al. 2019).

Frühere Studien an Hefezellen haben bereits gezeigt, dass unterschiedliche p53-Mutationen auch unterschiedliche Effekte darauf haben, inwieweit mutiertes p53 die Transkription von Zielgenen stimulieren kann (auch Transaktivierung genannt) (Kato et al. 2003). Hier konnten sehr unterschiedliche Transaktivierungs-Fähigkeiten von unterschiedlichen p53-Mutanten je nach Zielgen festgestellt werden (Resnick und Inga 2003; Kato et al. 2003). Zusätzlich kann von der residualen Transaktivierungs-Fähigkeit von mutiertem p53 keine direkte Korrelation zu dessen tumorsuppressiver Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, hergestellt werden (Kakudo et al. 2005).

A



B

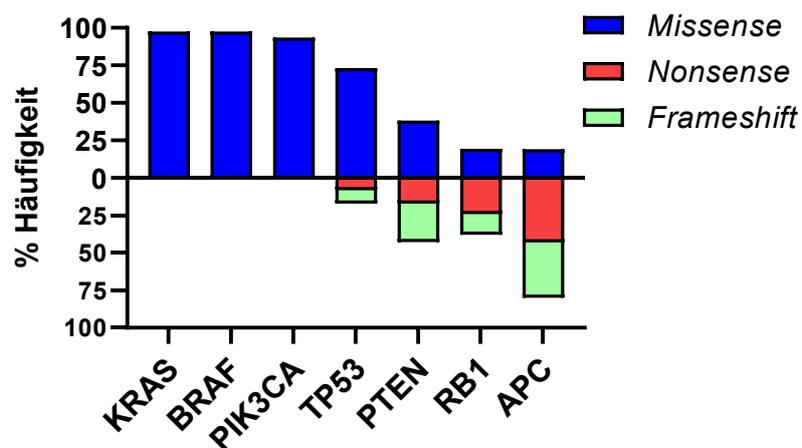


Abbildung 5: Mutationsmuster von *TP53* und im Vergleich mit anderen Tumorsuppressoren und Onkogenen.

A: Mutationseffekte von *TP53* in menschlichen Tumoren (n= 28866) (basierend auf Bouaoun et al. 2016; Soussi und Wiman 2015).

B: *TP53*-Mutationseffekte aus A verglichen mit typischen Onkogenen (links von *TP53*) und anderen, typischen Tumorsuppressorgenen (rechts von *TP53*). *KRAS* (n=47336), *BRAF* (n= 56864), *PIK3CA* (n= 17349), *TP53* (n=28866), *PTEN* (n= 6519), *RB1* (n=3189), *APC* (n=10722) (basierend auf Soussi und Wiman 2015).

Um nun die tumorsuppressive Fähigkeit einzelner p53-Mutanten ermitteln zu können, müssen experimentell die daraus resultierenden Phänotypen charakterisiert werden (Kotler et al. 2018). Zum Screening dieser Mutanten in einem hohen Durchsatz wurden sogenannte *Libraries* verwendet, die viele verschiedene Sequenzen unterschiedlicher Mutationen von *TP53* besitzen (vgl. Kitzman et al. 2015). Dadurch können innerhalb eines Experiments viele einzelne Punktmutationen gleichzeitig untersucht werden (Kotler et al. 2018). Das Ersetzen einer bestimmten Aminosäure mit jeder einzelnen anderen codierenden Aminosäure wird saturierte Mutagenese genannt (Reetz und Carballeira 2007). 2018 wurde von Kotler et al. erstmals eine saturierte Mutagenese der DNA-bindenden Domäne von p53 *in vitro* durchgeführt (Kotler et al. 2018). Dafür wurden lentivirale Vektoren mit einem mutierten p53-Leserahmen (ORF, *open reading frame*) in Zellen transduziert, die vorher kein p53 exprimiert hatten (p53-*null*). Anschließend wurden die Zellen an drei Zeitpunkten innerhalb von 14 Tagen nach Infektion geerntet und die An- bzw. Abreicherung jeder einzelnen Mutante in diesem Zeitraum (*relative fitness score*) berechnet.

Projekte wie diese dienen dazu, eine umfassende funktionelle Charakterisierung von p53-Mutationen zu erreichen, die essenziell ist, um später optimale Therapieschemata und Prognosebedingungen für Patient:innen schaffen zu können.

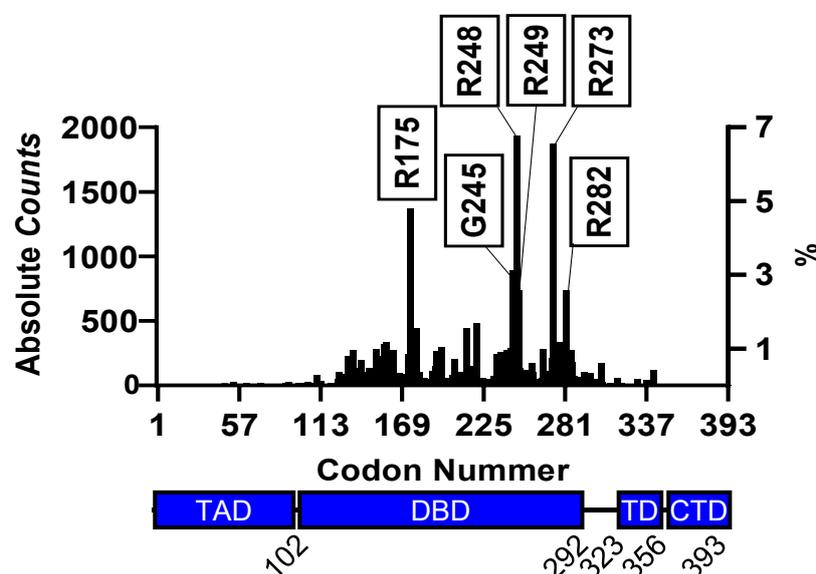


Abbildung 6: Verteilung der am häufigsten mutierten Codons von *TP53* in menschlichen Tumoren. $n = 27847$. Die sechs am häufigsten mutierten Codons (*hotspot*-Codons) wurden beschriftet. Unterhalb des Diagramms sind Bereiche markiert, die für unterschiedliche Domänen von p53 kodieren. TAD = Transaktivationsdomäne; DBD = DNA-bindende Domäne; TD = Tetramerisierungs-Domäne; CTD = Carboxy-terminale Domäne (basierend auf Stiewe und Haran 2018; Tate et al. 2019; TCGA Research Network).

1.4. Die Methoden der Genomeditierung

1.4.1. Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Wie bereits erwähnt, wird durch Proteine wie p53 die Zellproliferation bei genotoxischem Stress pausiert (Appella und Anderson 2001). Anschließend können Schäden, wie zum Beispiel DNA-Doppelstrangbrüche, behoben werden. Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kommen hauptsächlich drei unterschiedliche Mechanismen infrage (Huertas 2010). Erstens, die nicht-homologe End-zu-End Verknüpfung (*non-homologous end joining*, NHEJ), die zu jeder Phase des Zellzyklus stattfinden kann (Lieber 2010; Wilson et al. 1982). Bei NHEJ werden zwei DNA-Enden durch den Ku70/80-Komplex gebunden und können bei einem glatten Doppelstrangbruch direkt wieder miteinander ligiert werden (Rassow et al. 2016, S. 527; Sakuma et al. 2016) (Abbildung 7). Zusätzlich können die DNA-Enden zunächst durch Nukleasen so restringiert werden, dass sie wieder zueinander passen, anschließend mit einer DNA-Polymerase resynthetisiert und mit einer Ligase wieder ligiert werden (Bowater und Doherty 2006). Bei dieser Prozessierung kann es zu Insertionen oder Deletionen kommen, deshalb ist die NHEJ generell recht fehleranfällig (Lieber 2010).

Als zweites kann bei Unverfügbarkeit von NHEJ die Mikrohomologie-vermittelte End-zu-End Verknüpfung (*microhomology-mediated end joining*, MMEJ; auch alternatives EJ) stattfinden (McVey und Lee 2008). Dieser Mechanismus verwendet 5-25 Basenpaar (bp) lange Mikrohomologie-Sequenzen an den DNA-Enden, die neu verknüpft werden (Lieber 2010) (Abbildung 7). Dadurch kommt es jedoch immer zu Deletionen um die ehemalige Bruchstelle herum (McVey und Lee 2008).

Der dritte Weg ist die homologe Reparatur (*homology-directed repair*, HDR), die nur zustande kommen kann, wenn sich eine homologe DNA-Sequenz im Nukleus befindet (Featherstone und Jackson 1999). Zum Beispiel passiert das im Rahmen der homologen Rekombination in der späten S-Phase oder G2-Phase des Zellzyklus, wenn die DNA verdoppelt in zwei Schwesterchromatiden vorliegt (Rassow et al. 2016, S. 527). Zur Reparatur des Doppelstrangbruchs kann nun das unbeschädigte Schwesterchromatid als Vorlage herangezogen werden, wodurch eine sehr effiziente, meist fehlerfreie Reparatur der Läsion möglich ist (Li und Heyer 2008) (Abbildung 7). HDR kann aber auch möglich sein, indem statt eines gesamten Schwesterchromatids nur eine kleine Homologie-Sequenz intranukleär für den Bereich um den Doppelstrangbruch herum vorhanden ist,

zum Beispiel im Rahmen eines Plasmids, was experimentell in eine Zelle gebracht wurde (Featherstone und Jackson 1999).

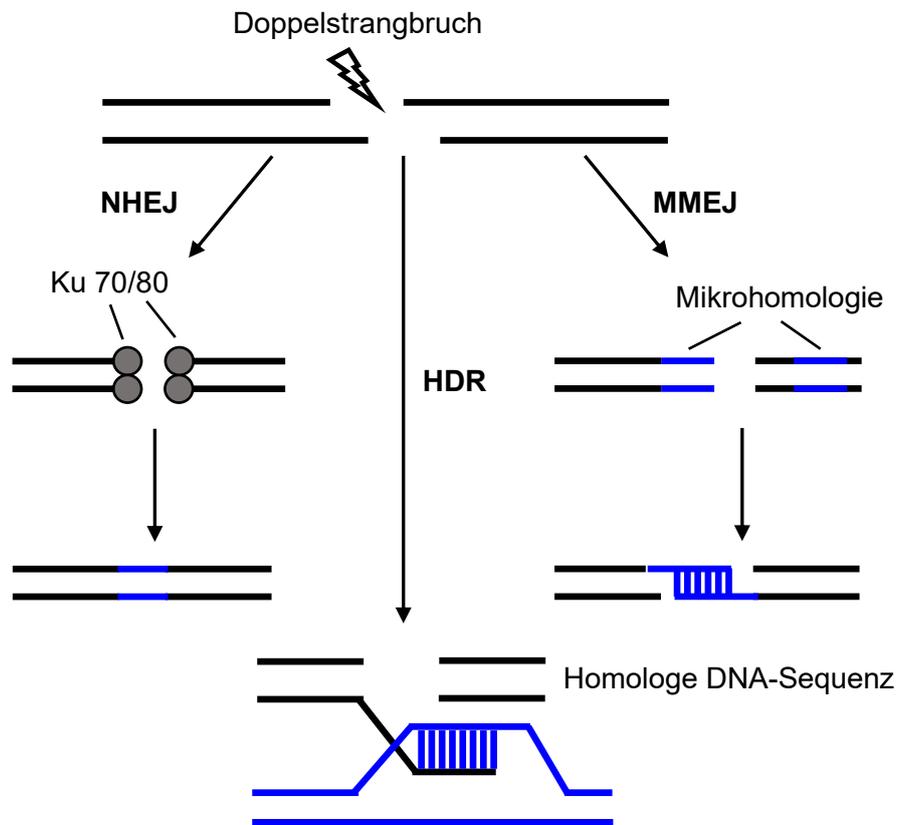


Abbildung 7: Schematische Darstellung der drei Haupt-Reparaturmechanismen einer Zelle nach Doppelstrangbruch.

NHEJ = *Non-Homologous End Joining*, HDR = *Homology-Directed Repair*, MMEJ = *Microhomology-Mediated End Joining*. Basierend auf Sakuma et al. (2016).

1.4.2. CRISPR/Cas9

Das in dieser Arbeit verwendete CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) / Cas9 (CRISPR-assoziierte Nuklease 9) - System hat die Möglichkeiten, Zellen gezielt editieren zu können, revolutioniert, weshalb für die Entdeckung auch der Nobelpreis der Chemie 2020 verliehen wurde (Jinek et al. 2012). Das CRISPR/Cas9-System ist ein natürlicher Abwehrmechanismus, mit dem sich Bakterien gegen Eindringlinge, wie zum Beispiel Viren, verteidigen können (Barrangou et al. 2007). Hierzu wird fremde DNA des Eindringlings in das Genom des Wirts eingebaut (Protospacer-DNA), anschließend werden davon RNA-Sequenzen (CRISPR RNA, crRNA) transkribiert (Horvath und Barrangou 2010) (Abbildung 8). Diese crRNAs haben an ihrem 5' Ende eine mindestens 20 bp lange komplementäre Sequenz zur Protospacer-DNA und lagern sich mit einer partiell komplementären tracrRNA (*trans-*

activating crRNA) zusammen (Deltcheva et al. 2011). Diese RNAs agieren zusammen mit der Nuklease Cas9, indem die crRNA:tracrRNA die Cas9 zu der entsprechenden Stelle der Fremd-DNA führt (deshalb wird crRNA:tracrRNA auch *single guide RNA*, sgRNA genannt) und diese durch Bindung mit der Protospacer-Sequenz markiert (Jinek et al. 2012; Sander und Joung 2014). Anschließend führt die Cas9-Nuklease einen Doppelstrangbruch neben der gebundenen sgRNA durch, zwischen drittem und viertem Nukleotid *upstream* der sogenannten PAM-Sequenz (*Protospacer-adjacent motif*) (Mojica et al. 2009). Bei der hier verwendeten Cas9, die aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* isoliert wurde (SpCas9), besteht diese PAM-Sequenz aus den Basen NGG und liegt unmittelbar 3' von der sgRNA-Sequenz (Sander und Joung 2014).

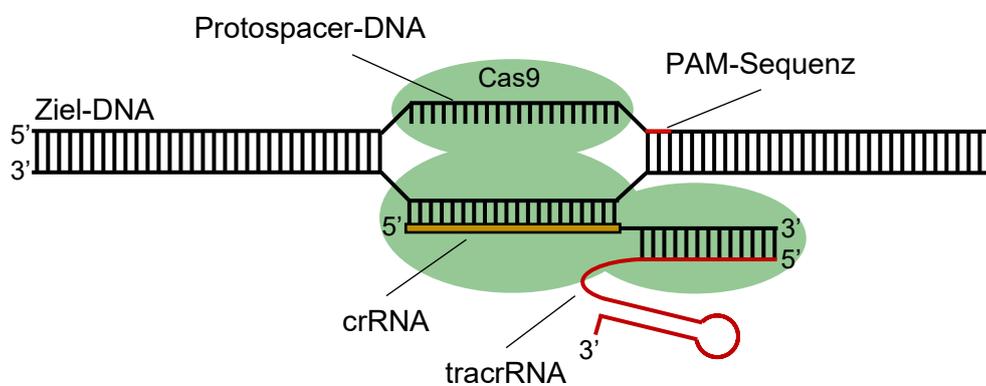


Abbildung 8: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas9-Systems.

Basierend auf: Jinek et al. (2012).

Dieses System konnte daraufhin so modifiziert werden, dass es auch in Zellen anderer Lebewesen angewendet werden kann (Le Cong et al. 2013). Durch Einschleusen von sgRNAs mit spezifischer Sequenz kann so an festgelegten Stellen ein Doppelstrangbruch induziert werden (Jinek et al. 2012). So können beispielsweise gezielt Gene deaktiviert werden, da nach dem Doppelstrangbruch durch induziertes NHEJ deaktivierende Deletionen oder Insertionen (sog. *Indels*) entstehen können (Le Cong et al. 2013).

Darüber hinaus kann durch simultanes Einschleusen einer DNA-Sequenz, die an ihren Enden komplementär zu den entstandenen Enden des Doppelstrangbruchs ist (Donor-DNA), die HDR der Zellen induziert werden (Le Cong et al. 2013). Dadurch können gewünschte Änderungen der DNA-Sequenz durchgeführt werden, indem zuvor spezifische Veränderungen, wie etwa Punktmutationen auf der Donor-DNA vorgenommen wurden. Natürlicherweise ziehen Zellen jedoch NHEJ dem HDR vor (Symington und Gautier 2011), sodass in Experimenten mit CRISPR/Cas9 in

Säugetierzellen meist nur eine geringe Effizienz erreicht werden konnte (Komor et al. 2016).

Cas9 besitzt zwei unterschiedliche Domänen für das Schneiden des DNA-Strangs, eine für den codogenen und eine für den nicht-codogenen Strang (Jinek et al. 2012). Somit kann durch bestimmte Aminosäuresubstitutionen, wie zum Beispiel Aspartat zu Alanin an Position 10 (D10A), bei Cas9 die Aktivität einer Nukleasedomäne deaktiviert werden, während die DNA-Bindungsfähigkeit erhalten bleibt, wodurch sie nur noch einen statt beider DNA-Stränge schneiden kann (sogenannte Nickase, nCas9) (Jinek et al. 2012; Le Cong et al. 2013). Die Reparatur dieser Einzelstrangbrüche kann dann entweder nahtlos oder durch HDR erfolgen, wodurch die Rate des fehleranfälligen NHEJ reduziert wird (Mali et al. 2013; Le Cong et al. 2013). Bei Deaktivierung beider Cas9-Domänen, die für die DNA-Strangbrüche zuständig sind, kann eine katalytisch komplett defiziente Cas9 (dCas9) generiert werden (Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012).

Auch mit teilweise oder vollständiger katalytischer Inaktivität werden nCas9 bzw. dCas9 weiterhin durch sgRNAs zu der entsprechenden Protospacer-DNA-Sequenz geleitet (Qi et al. 2013; Hsu et al. 2013; Sander und Joung 2014). So können beispielsweise heterologe Effektoren, die am Cas9-Protein hängen, zu einer spezifischen Sequenz geleitet werden (Perez-Pinera et al. 2013). Durch Verknüpfung von dCas9 z.B. mit einem Transkriptionsfaktor kann eine Steigerung der Genexpression erreicht werden, indem dCas9 mit einer entsprechenden sgRNA den Transkriptionsfaktor zu dem entsprechenden Promoter rekrutiert (Bikard et al. 2013; Perez-Pinera et al. 2013).

1.4.3. Base Editing

Bei einer recht neuen Methodik, genannt *Base Editing*, wurde sich diese Verknüpfung einer Cas9 mit einem Fusionsprotein ebenfalls zu Nutze gemacht, indem eine Desaminase mit einer nCas9 verknüpft wurde (Komor et al. 2016; Wang et al. 2018) (Abbildung 9). Dieses Konstrukt, genannt *Base Editor*, kann durch Desaminierung Basensubstitutionen von Cytosin zu Thymin (C zu T) durchführen. Schon lange ist bekannt, dass diese Art des Basenaustauschs auch im menschlichen Körper beobachtet werden kann (Greenblatt et al. 1994). Insgesamt sind C zu T Basensubstitutionen die am häufigsten beobachteten Mutationen von *TP53* in menschlichen Tumoren (Bouaoun et al. 2016) (Abbildung 10 A) und C zu T Transitionen an CpG-Inseln (s. unten) sind die am häufigsten beobachteten Mutationen in menschlichen Erkrankungen (Schübeler 2015).

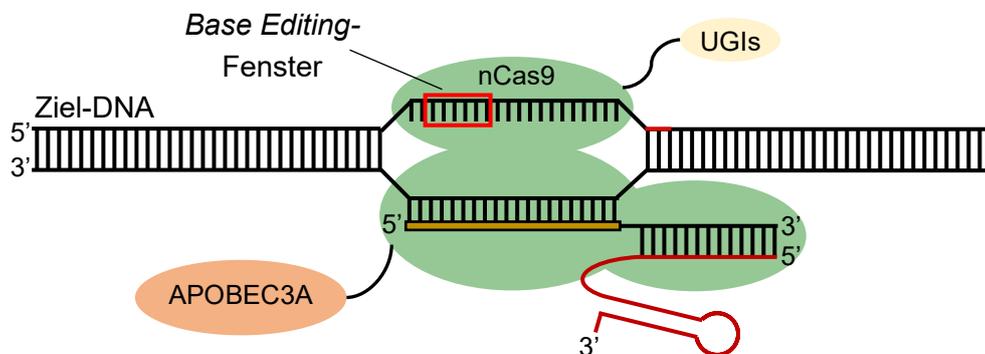


Abbildung 9: Schematische Darstellung des *Base Editors*.

UGIs = Uracil-DNA-Glykosylase-Inhibitoren.

Eine spontane Desaminierung von Cytosin resultiert in der Base Uracil, die normalerweise nicht in der DNA vorkommt (Rassow et al. 2016, S. 521) (Abbildung 10 B). Uracil kann deshalb von dem Korrekturenzym Uracil-DNA-Glykosylase erkannt und repariert werden (Schübeler 2015). Wird dies jedoch nicht rechtzeitig erkannt, resultiert dies bei der nächsten DNA-Replikation in einer Basensubstitution von C zu T, da Uracil die gleiche Bindungseigenschaften wie Thymin hat (Rassow et al. 2016, S. 521). Außerdem liegt Cytosin zur Transkriptionsregulation oftmals methyliert als 5-Methylcytosin vor (Vardimon et al. 1982; Schübeler 2015). Diese Methylierung geschieht hauptsächlich an Cytosin-Basen auf die eine Guanin-Base folgt (CpG-Dinukleotide) und ist essenziell für die Entwicklung eines Organismus, da durch die Methylierung epigenetisch z.B. die Expression von Genen reguliert werden kann (Suzuki und Bird 2008). Die Desaminierung von 5-Methylcytosin resultiert in der

Base Thymin, die nicht von der Uracil-DNA-Glykosylase erkannt werden kann und somit eine Reparatur erschwert ist (Weinberg 2014, S. 540) (Abbildung 10 B).

Diese Desaminierung kann nun gezielt von Desaminasen, wie die in dieser Arbeit verwendete APOBEC3A (Apolipoprotein B mRNA *editing* enzyme, *catalytic polypeptide-like* 3A), katalysiert werden (Teng et al. 1993). Da jedoch die meisten Desaminasen, wie auch APOBEC3A, ursprünglich Teil des RNA-*Editosoms* sind, sind sie nur an einzelsträngiger DNA aktiv (Harris et al. 2002).

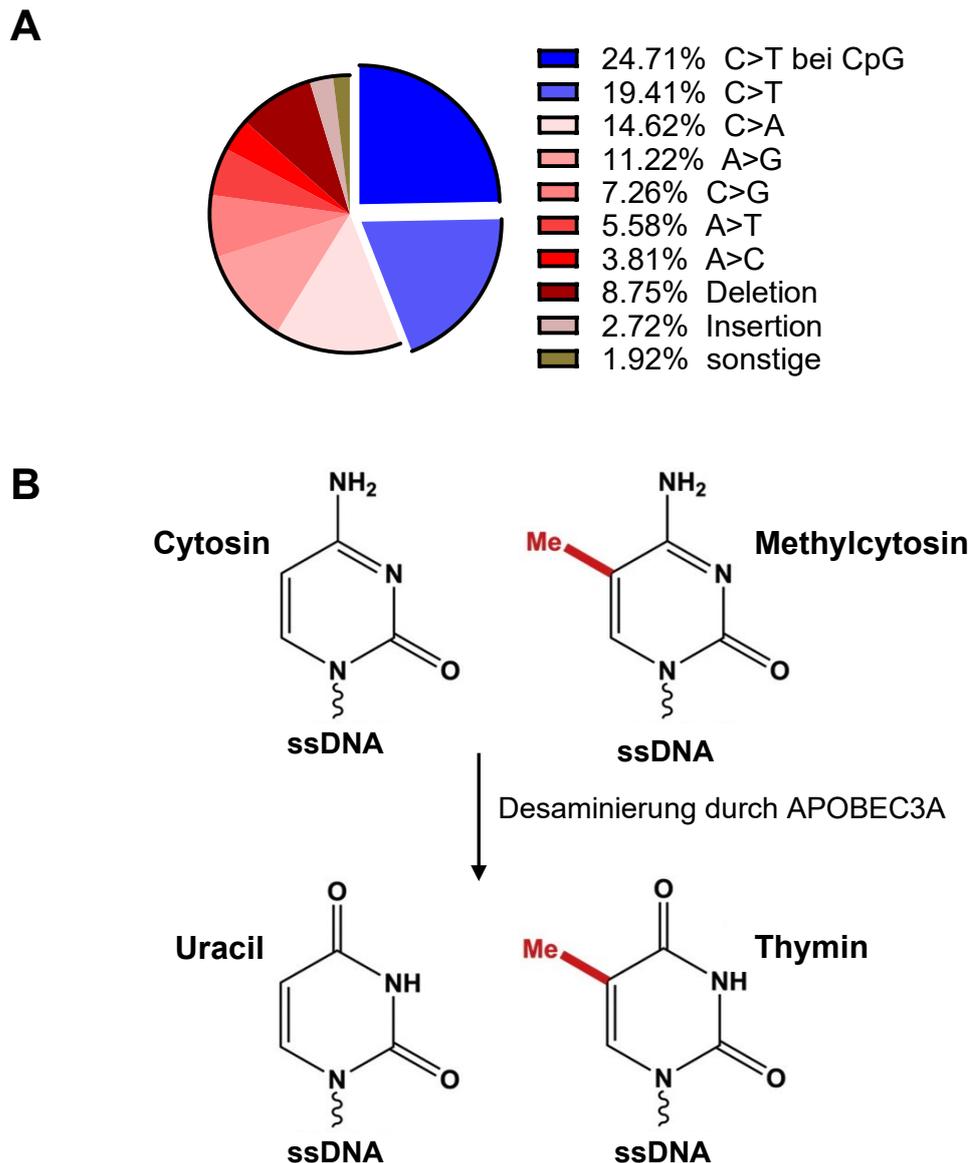


Abbildung 10: Mutationstypen in TP53 und Desaminierung des Base Editors

A: Darstellung der häufigsten Mutationstypen in menschlichen TP53 unter Hervorhebung der C>T Mutanten (N=28866). Basierend auf: Bouaoun et al. (2016)

B: Darstellung der Desaminierung von Cytosin oder Methylcytosin im Rahmen des Base Editing. ssDNA = Einzelsträngige DNA, da die verwendete Desaminase nur an einzelsträngiger DNA agieren kann. Me = Methylgruppe (CH₃). Verändert aus Ito et al. (2017).

Bei Untersuchung der Cas9 (wie auch nCas9 und dCas9) fiel auf, dass im Rahmen der komplementären Bindung der sgRNA mit der Protospacer-DNA die letztere durch Cas9 in Einzelstränge aufgetrennt wird (Jore et al. 2011). Dies geschieht unter Ausbildung eines sogenannten *R-Loops* (Thomas et al. 1976). An diesem freiliegenden DNA-Strang können nun durch Enzyme wie beispielsweise der APOBEC3A, die mit einer nCas9 oder dCas9 verknüpft ist und dadurch auch direkt an diesem freiliegenden Einzelstrang lokalisiert ist, Basensubstituierungen durch Desaminierung durchgeführt werden (Komor et al. 2016; Wang et al. 2018). Diese Desaminierung erfolgt in einem bestimmten *Editing-Fenster*, bezogen auf die Zielsequenz der verwendeten sgRNA, was bei der APOBEC3A als Base 2-13 der sgRNA aus 5'-Richtung definiert ist (Wang et al. 2018). Dieses weite *Editing-Fenster* kommt durch die sehr hohe C zu T Transitionseffizienz der humanen APOBEC3A (hA3A) zustande (Ito et al. 2017). Um das *Editing-Fenster* zu schmälern und damit die Präzision des *Base Editors* zu erhöhen, wird die Desaminase-Aktivität von hA3A durch die Punktmutation Y130F verringert (Shi et al. 2017; Wang et al. 2018). Der in dieser Arbeit verwendete *Base Editor* pCMV-hA3a-eBE-Y130F (Wang et al. 2018) zeigt ein *Editing-Fenster* der sgRNA-Zielsequenz von Base 3-8 aus 5'-Richtung (Wang et al. 2019) (Abbildung 9). Die nCas9 wird der dCas9 in diesem Rahmen vorgezogen, da durch Einzelstrangbruch des nicht-desaminierten Strangs der desaminierte und dadurch veränderte Strang als neue Vorlage zur Reparatur verwendet wird (Huang et al. 2021). Dadurch erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Editierung (Huang et al. 2021). Die Editierungseffizienz wird zusätzlich erhöht, indem der natürliche Reparaturmechanismus des entstehenden Uracils durch die Uracil-DNA-Glykosylase durch mehrere Kopien des entsprechenden Uracil-DNA-Glykosylase-Inhibitors (UGI), die ebenfalls als Fusionsproteine an der Desaminase hängen, gehemmt wird (Nishida et al. 2016).

Insgesamt kann so die Editierungseffizienz bestimmter genomischer Loci im Vergleich zu CRISPR/Cas9 und HDR deutlich gesteigert werden, jedoch mit einer deutlich eingeschränkteren Flexibilität (Kim et al. 2017; Komor et al. 2016).

1.5. Ziele des Projekts

1.5.1. Die Generierung von H460^{Δ/Δ/LSL} *PuroS* Zellen

Durch ein immer umfassenderes Bild der molekularbiologischen Vorgänge in Tumorzellen haben sich die onkologischen Therapieansätze in den letzten Jahren immer mehr in Richtung einer Patienten-individuellen Behandlung entwickelt (Cheng et al. 2019; Gambardella et al. 2020). Für einige Onkogene sind mittlerweile Inhibitor-Moleküle zugelassen, die Tumorphiliferation verhindern, indem sie spezifisch bestimmte Genotypen eines Tumors hemmen (z.B. Slamon et al. 2001; O'Brien et al. 2003; Shaw et al. 2013). Die medikamentöse Reaktivierung eines Tumorsuppressors wie p53 zu induzieren, ist jedoch schwieriger als Onkogene in Tumoren zu inhibieren (Morris und Chan 2015). Es wurde zwar *in vivo* gezeigt, dass eine experimentelle Reaktivierung von p53 eine Tumorregression bewirkt (Klimovich et al. 2022; Ventura et al. 2007), jedoch ist bis heute kein auf mutiertes p53-zielendes Medikament in der Krebstherapie zugelassen (Zhu et al. 2020) (Stand Juli 2022). Neben der Entwicklung neuer, auf mutiertes p53 zielender Medikamente (Sallman 2020; Bykov et al. 2018), kann ein weiterer Ansatz sein, die Funktionalität einzelner p53-Mutanten genau zu charakterisieren, um dann feststellen zu können, welche konventionellen onkologischen Therapieansätze am geeignetsten sind, um einen Tumor mit einer spezifischen Mutante behandeln zu können. Insgesamt ist aber immer noch viel zu wenig über das Verhalten und den Charakter der allermeisten Nicht-*hotspot*-Mutanten bekannt, die im Gesamten 70 % des p53-Mutoms ausmachen (Bouaoun et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Zelllinie generiert, in der beliebige Mutationen direkt in den endogenen *TP53*-Lokus eingebaut werden können. Diese p53-Mutanten können so unter physiologischer Expression und unter Erhalt physiologischer Regelkreise beobachtet und charakterisiert werden. Diese Mutagenese erfolgte durch CRISPR/Cas9 und HDR, bei der durch Mutationen im Donor-Vektor gewünschte Mutationen in den genomischen Locus eingebaut werden konnten (Jinek et al. 2012).

Um diese Zelllinie generieren zu können, sind einige Umwege nötig, da sich eine direkte Editierung des endogenen Locus durch CRISPR/Cas9 und HDR in vorigen Studien als recht ineffizient gezeigt hatte, insbesondere weil durch den induzierten Doppelstrangbruch das WTp53 der H460-Zellen aktiviert wird (Mali et al. 2013; Wang et al. 2013). Um zudem unerwünschte und unkontrollierbare Ereignisse der anderen p53-Allele während der Mutagenese zu vermeiden, wurden zwei der drei Allele durch

Deletionen inaktiviert, wodurch nur ein Allel editiert und exprimiert wurde. Auf das später zu editierende Allel wurde eine loxP-EF1 α -eGFP-T2A-PAC-STOP-PolyA-loxP – Kasette (im Folgenden: LSL-Kasette) über CRISPR/Cas9 und HDR eingebaut. Zur Steigerung der HDR-Effizienz befanden sich der LSL-Kasette vor- und nachgeschaltet zwei der *TP53*-Sequenz entsprechenden Homologie-Arme (HA1 und HA2). Die LSL-Kasette exprimierte über den EF1 α -Promoter Grün-fluoreszierendes Protein (GFP), sowie eine Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC, codierenden Gen: *pac*) (Vara et al. 1985). Das entstehende Protein der exprimierten polycistronischen mRNA wird während der Translation durch das dazwischen eingefügte T2A-Peptid getrennt (Ryan et al. 1991). Die PolyA-Sequenz zusammen mit dem Stopp-Codon führte zum Transkriptionsabbruch und dadurch zu einem *TP53-Knockout*-Allel. Die flankierenden loxP-Sequenzen dienen der späteren Rekombination durch die Cre-Rekombinase (Sauer und Henderson 1988), die über einen adenoviralen Vektor eingebracht wurde. Nach erfolgreicher Rekombination entsteht so wieder ein aktiv exprimierendes *TP53*-Allel. Nach Etablierung dieser Zelllinie wurden anschließend erste Mutagenese-Experimente im kleinen Rahmen durchgeführt, um die generelle Funktionalität des Systems zu validieren. In Zukunft können so die meisten p53-Mutanten generiert werden. Anschließend können diese Mutanten in ihrer Funktion charakterisiert werden und es kann getestet werden, welche bekannten Therapieoptionen für die jeweilige Mutante optimal sind.

1.5.2. Mutagenese von Exon 8 durch den *Base Editor*

Base Editing ist eine recht neue Methode der Baseneditierung, mit Erstetablierung im Jahr 2016 (Komor et al. 2016). Der hier verwendete *Base Editor* pCMV-hA3a-eBE-Y130F wurde relativ kürzlich im Jahr 2018 generiert und getestet (Wang et al. 2018). Da diese Methodik jedoch eine sehr hohe Baseneditierungs-Effizienz von >90 % je nach genomischen Lokus gezeigt hatte, wirkte dies sehr vielversprechend und sollte im Rahmen dieser Arbeit an weiteren Zelllinien bezüglich der Effizienz und Spezifität getestet werden. Auch wenn die Flexibilität des Einsatzes eingeschränkt ist, da nur C zu T-Editierungen möglich sind und dies auch nur in unmittelbarer Nähe einer NGG-Sequenz, besteht die Möglichkeit, *TP53-hotspot*-Codons wie etwa R273 oder R282 sehr effizient zu mutieren. Zusätzlich wurde eine Art *Base Editor*-Library des Exon 8 von *TP53* transfiziert. Dies ermöglichte Einblicke in die Baseneditierungs-Effizienz, aber konnte auch erste Aussagen über die Prädiktabilität der editierten Basen und das bevorzugte *Base Editing*-Fenster geben.

2. Material

2.1. Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	<i>TP53</i> -Status	Beschreibung
NCI-H460	WT/WT/WT	Humane großzellige Lungenkarzinom-Zellen mit WT- <i>TP53</i> auf 3 Allelen
NCI-H460	WT/WT/LSL	Humane großzellige Lungenkarzinom-Zellen mit LSL-Kassette auf 1 <i>TP53</i> -Allel und 2 WT- <i>TP53</i> -Allelen
NCI-H460	Δ/Δ /LSL	Humane großzellige Lungenkarzinom-Zellen mit LSL-Kassette auf 1 <i>TP53</i> -Allel und 2 <i>knockout-TP53</i> -Allelen
NCI-H460	$\Delta/\Delta/+^{mut}$	Humane großzellige Lungenkarzinom-Zellen mit 1 aktiven, punktmutierten <i>TP53</i> -Allel und 2 <i>knockout-TP53</i> -Allelen
HCT116	WT/WT	Humane Kolorektalkarzinom-Zellen mit WT- <i>TP53</i> auf 2 Allelen
HCT 116	Δ /WT	Humane Kolorektalkarzinom-Zellen mit 1 WT- <i>TP53</i> - und 1 <i>Knockout-TP53</i> -Allel

2.2. Bakterien

Tabelle 2: Bakterien

Name	Bakterienstamm	Hersteller
ElectroMAX™ DH10B	Escherichia Coli (elektrokompetent)	Thermo Fisher Scientific

2.3. Viren

Tabelle 3: Viren

Virusart	Name	Bestellnummer	Hersteller
Adenovirus	VQ-Ad-CMV-Cre	23349	ViraQuest, Inc.

2.4. Antikörper

Folgende Antikörper wurden im Rahmen dieser Forschung verwendet. Alle verwendeten Antikörper wurden in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T verdünnt.

Tabelle 4: Primäre Antikörper

Name	Verdünnung	Organismus	Hersteller	AG Stiewe Interne Nummer
α - p53 DO-1	1:5.000	Maus	Dr. B. Vojtesek	103
α - β - Aktin	1:2.500	Maus	Abcam	180
α - p21	1:200	Maus	SantaCruzBiotech	462
α - mdm2 Hybridoma- Überstand	1:1	Maus	Christine Blattner	550

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Organismus	Hersteller	AG Stiewe Interne Nummer
Maus - IgG; HRP- <i>linked</i>	1:1.250	Schaf	Amersham	11
Maus - IgG (H+L); Alexa Fluor 488- <i>linked</i>	1:2.500	Ziege	Invitrogen	265

2.5. Enzyme und Enzympuffer

Tabelle 6: Enzyme und Enzympuffer

Name	Artikelnummer	Hersteller
5x <i>Colorless</i> GoTaq® <i>Reaction Buffer</i>	M7921	Promega GmbH
BbsI (10.000 U/ml)	R0539	New England Biolabs
Bsa1-HF®v2 (20.000 U/ml)	R3733	New England Biolabs
CutSmart® Puffer	B7204	New England Biolabs
EcoRI-HF® (20.000 U/ml)	R3101	New England Biolabs
GoTaq® DNA-Polymerase	M3001	Promega GmbH
NEBuffer™ 2.1	B7202	New England Biolabs
QIAGEN Proteinase K	19131	QIAGEN N.V.
RNAse A (DNase-frei)	A3832	AppliChem GmbH
T4 DNA-Ligase (400.000 U/ml)	M0202	New England Biolabs
Standard Taq (<i>Mg-free</i>) <i>Reaction Buffer Pack</i>	B9015S	New England Biolabs

2.6. Plasmide

Tabelle 7: Plasmide

Name	Hersteller	AG Stiewe interne Nummer
MCS1-EF1 α -GFP-T2A-Puro-pA-MCS2-PGK-hsvTK	System Biosciences, LLC (HR700PA-1)	E554
px330 Intron5_sg7	AG Stiewe, S. Mutlu	E829
HR700_R175_mutant_library	AG Stiewe, M. Klimovich	F033
px459-sgRNA_in5_p53+T	AG Stiewe, M. Klimovich	F119
HR700-PA+HA1S+HA2L_R175_CRISPR_R175H	AG Stiewe, J. Funk	F167
HR700-PA+HA1S+HA2L_R175_CRISPR_R175P	AG Stiewe, J. Funk	F168
HR700-PA+HA1S+HA2L_R175_CRISPR_R175Stop	AG Stiewe, J. Funk	F169
HR700-PA+HA1_S+HA2_L_GoldenGate	AG Stiewe, J. Schneikert	F256
pX459_Hygro_sgPuro.3 sgRNA Puro.3	AG Stiewe, J. Funk	F428
HR700-PA+HA1_S+HA2_L_GoldenGate_insT_WT	Diese Arbeit	F691
pCMV-hA3A-eBE-Y130F	Jia Chen (Wang et al. 2018), (Addgene #113423)	F761
pGL3_U6_PGK_puro_sgLuc	AG Stiewe, J. Funk	F762
pGL3_U6_PGK_puro_sgR273_1	AG Stiewe, J. Funk	F763
pGL3_U6_PGK_puro_sgR273_2	AG Stiewe, J. Funk	F764
pGL3_U6_sgRNA_PGK_puromycin	Xinxu Huang (Shen et al. 2014), (Addgene #51133)	F765
pgl3-U6-sgRNA1-27insert_PGK-puro	Diese Arbeit	F819
pGL3-U6-sgRNA3_insert_PGK-puro	Diese Arbeit	F949
pEYFP-N1	AG Stiewe, O. Timofeev	OT9

2.7. Oligonukleotide

Folgende Primer, sgRNAs und siRNAs wurden während dieser Forschung verwendet.

Tabelle 8: Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	AG Stiewe interne Nr.
qPCR-Primer		
RTp21_for	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	63
RTp21_rev	CCGGCGTTTGGAGTGGTA	64
hp53_qPCR_for	ATCTACTGGGACGGAACAGC	4536
hp53_qPCR_rev	GCGGAGATTCTCTTCCTCTG	4537
hGAPDH_qPCR_for2	CTATAAATTGAGCCCGCAGCC	6502
hGAPDH_qPCR_rev2	ACCAAATCCGTTGACTCCGA	6503
PCR-Primer		
TP53-Ex5_for	GGGTTGCAGGAGGTGCTTAC	736
ENTR-p53-R	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC	1080
E2	ATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT	1384
TP53-Ex8-9Seq_rev	GCCCCAATTGCAGGTAAAAC	3488
T7 Assay hp53_2 rev	GATGGTGGTACAGTCAGAGCC	6535
T7_p53 Exon 5_rev	GCACATCTCATGGGGTTATAGGGA	6558
MCS2_HR700PA_1_f	GGGGGCTGTCCCTAGATCTATAA	7776
TP53_ex5_NGS_BC11_r	AGAACCAGAAGACTTGCCAACCTGGCCAAG ACCT	9624
p53_4_F	GGACCTGGTCCTCTGACTGCTC	9972
LSL-FW-4 (Puro)	GGCCTTCCATCTGTTGCTG	10152
#P53Int4-for1	CCCTTTGGCTTCCCTGTCAGTG	10255
TP53_mutPAM_f_BCO1	cgtacaagagacaAGCAATCAGTGAGGAA TCAGAGGCCTCC	10540
TP53_mutPAM_f_BCO3	cgtactagcagacAGCAATCAGTGAGGAA TCAGAGGCCTCC	10541
TP53_mutPAM_f_BCO5	tcttgagtatctgtAGCAATCAGTGAGGA ATCAGAGGCCTCC	10542
sgp53.13P6rev	GTCATCCAAATACTCCACACGCA	10875
p53_In1_fw1	GGTGACCCAGGGTTGGAAGTGT	13931
p53_Ex4_fw3	AGCAATGGATGATTTGATGCTG	13933
GFP_rev1	TGGGGTGGATGGCGCTCTTGAA	13934
TP53_NestedEx8fw1	TGCCTCTTGCTTCTCTTTTCCT	14026
TP53_NestedEx8fw2	TGGGAGTAGATGGAGCCTGGT	14027
TP53_NestedEx8rev2	CGCTTCTTGTCCTGCTTGCT	14028

TP53_NestedEx8rev1	TGCACCCTTGGTCTCCTCCA	14029
p53_in5_SpockDel_fw1	CAGGTCCTCTGATTCCTCAC	14030

Tabelle 9: sgRNAs

Name	Sequenz 5' → 3'
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD1	ccggGTAGTGGTAATCTACTGGGA
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD2	ccggGCCTCGCTTAGTGCTCCCTGG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD3	ccggGTGGGAGAGACCGGCGCACAG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD4	ccggGACCTCGCTTAGTGCTCCCTG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD5	ccggGAGAGAATCTCCGCAAGAAAG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD6	ccggGCCCCAGGGAGACTAAGCG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD7	ccggGAGATTACCACTACTCAGGAT
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD8	ccggGACTAAGCGAGGTAAGCAAGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD9	ccggGCCTGGGGCAGCTCGTGGTG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD10	ccggGGTGAGGCTCCCCTTTCTTG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD11	ccggGCTCACCACGAGCTGCCCCCA
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD12	ccggGATTCTCTTCTCTGTGCGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD13	ccggGACTGGGACGGAACAGCTTTG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD14	ccggGTGCGTGTTTGTGCCTGTCTT
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD15	ccggGCCAGTAGATTACCACTACTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD16	ccggGCGCCGGTCTCTCCCAGGAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD17	ccggGTGCCTGTCCTGGGAGAGAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD18	ccggGCTGAGTAGTGGTAATCTACT
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD19	ccggGTGCTCCCTGGGGCAGCTCG
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD20	ccggGTCTGTGCGCCGGTCTCTCCC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD21	ccggGAAGAGAATCTCCGCAAGAA
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD22	ccggGAAGAGAATCTCCGCAAGAAA
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD23	ccggGTTACCTCGCTTAGTGCTCCC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD24	ccggGTACCTCGCTTAGTGCTCCCT
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD25	ccggGCCTCACCACGAGCTGCCCCC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD26	ccggGCCTGAGTAGTGGTAATCTAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_FWD27	ccggGTGCGTGTTTGTGCCTGTCC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV1	aaacTCCCAGTAGATTACCACTAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV2	aaacCCAGGGAGCACTAAGCGAGGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV3	aaacCTGTGCGCCGGTCTCTCCCAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV4	aaacCAGGGAGCACTAAGCGAGGTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV5	aaacCTTTCTTGCGGAGATTCTCTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV6	aaacCGCTTAGTGCTCCCTGGGGGC

TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV7	aaacATCCTGAGTAGTGGTAATCTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV8	aaacGCTTGCTTACCTCGCTTAGTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV9	aaacCACCACGAGCTGCCCCAGGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV10	aaacCAAGAAAGGGGAGCCTCACC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV11	aaacTGGGGGCAGCTCGTGGTGAGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV12	aaacGCGCACAGAGGAAGAGAATC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV13	aaacCAAAGCTGTTCCGTCCCAGTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV14	aaacAGGACAGGCACAAACACGCAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV15	aaacGAGTAGTGGTAATCTACTGGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV16	aaacGTCCTGGGAGAGACCGGCGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV17	aaacGTCTCTCCAGGACAGGCAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV18	aaacAGTAGATTACCACTACTCAGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV19	aaacCGAGCTGCCCCAGGGAGCAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV20	aaacGGGAGAGACCGGCGCACAGAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV21	aaacTTCTTGCGGAGATTCTCTTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV22	aaacTTTCTTGCGGAGATTCTCTTC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV23	aaacGGGAGCACTAAGCGAGGTAAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV24	aaacAGGGAGCACTAAGCGAGGTAC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV25	aaacGGGGGCAGCTCGTGGTGAGGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV26	aaacGTAGATTACCACTACTCAGGC
TP53_sgRNA_eBE_Ex8_REV27	aaacGGACAGGCACAAACACGCAC
TP53_E984_WT_fw	GCGCTGCCCCACCATGAGCGCTGCTCAGATAGC
TP53_E984_WT_rev	CATCGCTATCTGAGCAGCGCTCATGGTGGGGCA

Tabelle 10: siRNAs

Name	Sequenz 5' → 3'	AG Stiewe interne Nr.
p53-si1	GAAAUUUGCGUGUGGAGUA	si284
p53-si3	GCAGUCAGAUCCUAGCGUC	si286
p53-si4	GGCGAAUAUUUCACCCUUC	si287
nsi	ON-TARGETplus <i>Non-Targeting Control</i> Pool von Dharmacon™	nsi153

2.8. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11: Chemikalien und Reagenzien

Name	Artikelnummer	Hersteller
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT, C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	A2948	AppliChem GmbH
2-Propanol Rotipuran®	6752	Carl Roth GmbH + Co. KG
6x Gel Loading Dye, Violett	B7024S	New England Biolabs
ABsolute qPCR Mix, no ROX	AB1132B	Thermo Fisher Scientific
Agar-Agar, bacteriological	2266	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agarose NEEO Ultra-Qualität Roti®Garose	2267	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ampicillin Natriumsalz	K029	Carl Roth GmbH + Co. KG
Aqua ad iniectabilia (H ₂ O)	35211	Berlin-Chemie AG
ATP-Lösung (10 mM)	PV3227	Thermo Fisher Scientific
BM Cyclin	10799050001	Roche (Merck KGaA)
Bovine Serum Albumin (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	5239	Carl Roth GmbH + Co. KG
Salzsäure Rotipuran® ≥ 32 % (HCl)	P074	Carl Roth GmbH + Co. KG
cComplete™ EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail	4693132001	Roche (Merck KGaA)
Dimethylsulfoxid (DMSO) Rotipuran®	4720	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	A2943	AppliChem GmbH
DMEM, high glucose, GlutaMAX™, Pyruvat	31966047	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)
dNTP-Set, 100 mM Lösung	R0182	Thermo Fisher Scientific
DPBS, kein Kalzium, kein Magnesium	14190	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ × 2 H ₂ O)	8043	Carl Roth GmbH + Co. KG
Essigsäure Rotipuran® (C ₂ H ₄ O ₂)	3738	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol Rotipuran®	9065	Carl Roth GmbH + Co. KG
Fötales Rinderserum Forschungsqualität	F0804	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
GeneRuler DNA Ladder Mix	SM0331	Thermo Fisher Scientific
Hefeextrakt	2363	Carl Roth GmbH + Co. KG
Hygromycin B Gold Lösung	ant-hg	InvivoGen

ISOTON® II Diluent	8546719	Beckman Coulter, Inc.
Kaliumacetat (KAc)	4986	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumchlorid (KCl)	A2939	AppliChem GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	A1043	AppliChem GmbH
Kanamycin	T832	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kristallviolett (C ₂₅ H ₃₀ N ₃ Cl)	C3886	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Lipofectamine® 2000 <i>Transfection Reagent</i>	11668	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
Lipofectamine® RNAiMax Transfection Reagent	13778	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
Magermilchpulver	A0830	AppliChem GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	141396	AppliChem GmbH
Methanol Rotipuran®	4627	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	3957	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydroxid (NaOH)	106469	Merck KGaA
Natriumhydroxid-Lösung (NaOH, 1 M)	35256	VWR International, LLC
Nonidet P40 Alternative Calbiochem®	492016	Millipore (Merck KGaA)
NuPAGE™ Antioxidans	NP0005	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
NuPAGE™ LDS Probenpuffer (4 x)	NP0007	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
NuPAGE™ MOPS SDS Laufpuffer (20 x)	NP0001	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
NuPAGE™ Proben-Reducing Agens (10 x)	NP0009	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
NuPAGE™ Transfer Buffer (20 x)	NP00061	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
Nutlin-3a	SML0580	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Opti-MEM™ I, GlutaMAX™	51985	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)
PageRuler™ <i>Prestained Protein Ladder</i>	26617	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	15140	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)

<i>Protein Assay Dye Reagent</i> Konzentrat	5000006	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Puromycin Dihydrochlorid	A11138	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)
QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2	A26358	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
RedSafe™ Nukleinsäure- Färbelösung (20.000 x)	21141	HiSS Diagnostics GmbH
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	61870036	Gibco™ (Thermo Fisher Scientific)
TaqMan® <i>Copy</i> <i>Number_GFP_seq_assay</i>	4400294	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
TaqMan™ Kopienanzahl- Referenzassay, RNase P	4403326	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
Tris PUFFERAN® (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	4855	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trypsin-EDTA-Lösung (10,000 U/ml)	T4174	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)
Trypton/Pepton aus Casein	8952	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tween® 20	A4974	AppliChem GmbH
WesternBright™ Sirius™ HRP Substrat	K-12043	Advansta, Inc.

2.9. Kits

Tabelle 12: Kits

Name	Artikelnummer	Hersteller
MiSeq Reagent Kit v2 Nano	MS-103-1001	Illumina, Inc.
Monarch® Total RNA Miniprep Kit	T2010S	New England Biolabs GmbH
NEBNext Multiplex Oligos für Illumina® <i>sequencing</i>	E7335S	New England Biolabs
NEBNext® ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina®	E6240	New England Biolabs
NucleoBond® Xtra Midi Kit	740410	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	51106	QIAGEN N.V
QIAquick® PCR Purification Kit	28106	QIAGEN N.V
QIAshredder™	79656	QIAGEN N.V
QIAxcel DNA <i>High Resolution</i> Kit	929002	QIAGEN N.V
QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip-Kits	A26316	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)

QuantStudio™ 3D Digitales PCR-Chip-Adapter-Kit	4485513	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
RNase-Free DNase Set	79256	QIAGEN N.V
RNeasy® Mini Kit	74106	QIAGEN N.V
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	11754	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
TOPO™ TA Cloning™ Kit	450071	Thermo Fisher Scientific

2.10. Puffer

Tabelle 13: Puffer

Puffer	Protokoll	Verwendung
Agar-Platten	1,5 % Agar-Agar LB-medium hinzugefügt, autoklaviert	Elektrotransformation von Bakterien (3.2.9)
<i>Annealing</i> -Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM NaCl	Golden-Gate Klonierung (3.2.8)
Einfriermedium	20 % (v/v) FBS 10 % (v/v) DMSO in RPMI Vollmedium	Einfrieren von Zellen (3.1.3)
Kristallviolett Färbelösung	3 % (v/v) Kristallviolett in 20 % (v/v) Ethanol	CFA (3.1.9)
Laufpuffer	5 % (v/v) 20x MOPS in 2 l H ₂ O	SDS-PAGE (3.3.3)
Ladepuffer (6x)	10 mM Tris-HCl (pH 7,4) 50 mM NaCl	Gelelektrophorese (3.2.3)
LB-Medium	85,5 mM NaCl 5 g/ L Hefeextrakt 10 g/ L Trypton pH 7,5 autoklaviert	Elektrotransformation von Bakterien, Mini-Präparation (3.2.9 f.)
NP-40 Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl 5 mM EDTA (pH 8,0) 2 % (v/v) NP-40 Frisch: 1:10 cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Generierung von Protein-Lysaten (3.3.1)
P1-Puffer	50 mM Tris (pH 7,5) 10 mM EDTA (pH 8) RNase A 100 µg/mL	Präparation von Plasmid-Minis (3.2.10)
P2-Puffer	1 % SDS 200 mM NaOH	
P3-Puffer	3 M KAc	

	pH wurde mit Essigsäure auf 5,5 adjustiert	
PBND-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) 2.5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,45 % (v/v) NP-40 0,45 % (v/v) Tween® 20 Frisch: 100 µg/ml Proteinase K	Isolation von genomischer DNA (3.2.1)
PBS (1x)	6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,5 mM KCl 140 mM NaCl pH 7,2, autoklaviert	vielfältig
TAE (50x)	40 mM Tris 20 mM acetic acid 1 mM EDTA (pH 8) adjustiert auf pH 8,0.	Gelelektrophorese (3.2.3)
TBS (10x)	50 mM Tris 150 mM NaCl in H ₂ O, adjustiert auf pH 7,6	SDS-PAGE (3.3.3), Blotting (3.3.4)
TBS-T (1x)	10 % (v/v) 10x TBS 0,1 % (v/v) Tween® 20 in H ₂ O	
Transferpuffer	5 % (v/v) NuPage Transferpuffer (20x) 15 % (v/v) MeOH in 2 l H ₂ O	Blotting (3.3.4)

2.11. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
384well <i>FrameStar</i> qPCR-Platten Roche LC480	4titude®
96 fast PCR Plate <i>full skirt</i>	Sarstedt AG & Co. KG
Biosphere® Filterspitzen (10, 20, 200, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co. KG
Cryo.s™ Einfriergefäß (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH
<i>EasyCap</i> Reagiergefäß 1,5 ml, PP	Sarstedt
Elektroporation-Küvette 1mm	Kaneka Eurogentec S.A.
Reagiergefäß (15 ml)	Otto E. Kobe KG
Reagiergefäß (50 ml)	Sarstedt

Glaspipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	A. Hartenstein GmbH
Immun-Blot PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Injekt® Solo Cone Syringes 10 ml	B. Braun Melsungen AG
Multiply® Pro tube 0,2 ml, PP	Sarstedt AG & Co. KG
NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Midi Protein Gels	Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific)
Parafilm® M	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Pasteur-Pipetten (Glas)	Otto E. Kobe KG
SafeSeal Reagiergefäß, PP (1,5, 2 ml)	Sarstedt
TC-Zellkultur-Multiwell-Platten mit Flachboden (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Sarstedt AG & Co. KG
TC-Zellkulturplatten mit Flachboden (6 cm, 10 cm, 15 cm)	Sarstedt AG & Co. KG
TipOne® Pipettenspitzen (10, 200, 1000)	STARLAB International GmbH
Zellschaber 25 cm	Sarstedt AG & Co. KG

2.12. Laborgeräte

Tabelle 15: Laborgeräte

Name	Hersteller
Agagel Standard Gelelektrophorese Kammer	Biometra GmbH
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Barnstead™ GenPure™ Pro Wasserpurifikation	Thermo Fisher Scientific
BD Accuri™ C6 plus Durchflusszytometer	Becton Dickinson GmbH
BioPhotometer® 6131 Spektrophotometer	Eppendorf AG
Bioruptor Twin UCD-400 Sonifizierer	Diagenode, Inc.
BVC control Flüssigkeits-Absaugsystem	Vacuubrand GmbH & Co. KG
Captair Biocap DNA/ RNA Hood	Erlab
ChemiDoc™ XRS+ Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Comfort Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr-International Deutschland GmbH
Criterion™ Blotting-Kammer	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Falcon™ Express™ Pipet-Aid®	Becton Dickinson GmbH
FiveEasy™ pH meter	Mettler-Toledo GmbH
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems™ (ThermoFisher Scientific)
Gel iX20 UV-Transilluminator	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
Heraeus® B6 Inkubator	Thermo Fisher Scientific

Heraeus™ Heracell 240	Thermo Fisher Scientific
HERAfreeze™ HLE Series <i>Ultra-Low</i> Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific
IKA IKAMAG RCT Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
KERN 440-47 Präzisionswaage	Kern&Sohn GmbH
LightCycler® 480	Roche Molecular Systems, Inc.
MasterCycler® Pro Thermocycler	Eppendorf AG
Microlab® STARlet <i>liquid handling system</i>	Hamilton Company
MicroPulser™ Elektroporations-Apparat	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Nalgene® (Thermo Fisher Scientific)
MS104S New Classic MF <i>analytical balance</i> Feinwaage	Mettler-Toledo GmbH
MSC-Advantage™ Klasse II biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific
Multitron Standard Inkubationsschüttler	Infors AG
NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Neubauer <i>Improved</i> Zellzählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pipetman® L	Gilson, Inc.
PowerPac™ 200 Netzteil	Bio-Rad Laboratories, Inc.
PowerPac™ Universal-Netzteil	Bio-Rad Laboratories, Inc.
ProfiLine Kühlschranks (4 °C)	Liebherr-International Deutschland GmbH
QIAcube®	QIAGEN N.V.
QIAxcel® <i>Advanced System</i>	QIAGEN N.V.
QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
QuantStudio™ 3D Digital PCR System	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
Reax 2000 Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
RM5 Rollenmischer	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH
Systec VE 150 Autoklaviergerät	Systec GmbH
ThermoMixer® C	Eppendorf AG
Transferpette™ S8 Multikanalpipette	Brand GmbH & Co. KG
WNB14 Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG
XCell4 SureLock™ Midi-Cell Elektrophoresesystem	Thermo Fisher Scientific

Z2 Coulter® Partikel-Zähler & Größe-Analysator	Beckman Coulter, Inc.
Zentrifuge 5810 R Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG

2.13. Software

Tabelle 16: Software

Name	Hersteller
Benchling	Benchling, Inc.
EditR (v. 1.0.10)	Kluesner et al. (2018)
FlowJo®	Becton Dickinson GmbH
GDS imager software	INTAS Science Imaging Instruments GmbH
GraphPad Prism	GraphPad Software
ICE	Synthego Lab.
ImageLab	Bio-Rad Laboratories, Inc.
LightCycler® 480	Roche Molecular Systems, Inc.
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation
NanoDrop® ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Photoshop CS6	Adobe Systems Software Ireland Limited
QIAxcel ScreenGel	QIAGEN N.V.
QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ Cloud Software	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
Scientific Illustration Toolkits	Motifolio, Inc.
Smart Servier Medical Art	Les Laboratoires Servier
TIDE	Bas van Steensel Lab.
VarScan2 (v. 2.3.9)	Richard K. Wilson Lab.

3. Methoden

3.1. Methoden in der Zellkultur

3.1.1. Inkubation und Kultivierung aller Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem befeuchteten Inkubator gelagert. Die Arbeit mit Zellen wurde unter sterilen Bedingungen unter einem Abzug mit laminarer Luftströmung vollzogen.

Die Zellen wurden in Dulbecco's *Modified Eagle* (DMEM) Medium (HCT116-Zellen) bzw. in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 Medium (H460-Zellen) kultiviert. Dieses wurde jeweils mit 10 % (v/v) fetalem bovines Serum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt. Im Folgenden wird dieses als Vollmedium bezeichnet.

Da im Rahmen dieser Forschung lediglich adhärente HCT116 bzw. H460-Zellen verwendet wurden, erfolgte die Kultivierung auf sterilen TC-Zellkulturplatten mit Flachboden (Sarstedt AG & Co. KG).

3.1.2. Passagieren der Zellen und Ernten von Zellen

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich vor Erreichen vollständiger Konfluenz gesplittet. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit Dulbecco's *Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen. Das Abtrennen der Zellen von der Platte erfolgte durch Verwendung von 2x Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) für circa 5 min bei 37 °C. Anschließend wurde die Reaktion unter Hinzugabe von neuem Vollmedium gestoppt und die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß übertragen. Nach Zentrifugation mit 100x g für 5 min wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in frischem Vollmedium resuspendiert und anschließend ein Teil davon (z.B. 1:10 oder 1:20) auf eine neue Zellkulturplatte übertragen.

Wenn die Zellen für ein Experiment außerhalb der Zellkultur geerntet werden sollten, wurde das Zellpellet nach Zentrifugation und Absaugen des Überstands mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde es erneut bei 100x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand erneut abgesaugt und das Zellpellet für weitere Experimente verwendet.

3.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um verschiedene Zellen, die in Experimenten verwendet wurden, langfristig zur Verfügung zu haben, wurden sie regelmäßig durch Aufnahme in einen Stickstofftank kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen zunächst auf 10 cm-Schalen ausgesät. Bei etwa 90 %iger Konfluenz wurden sie abtrypsiniert (3.1.2) und bei 100x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Das Gemisch wurde dann in 2 ml Kryo-Gefäße (Otto E. Kober KG) übertragen und kontinuierlich auf -80 °C heruntergekühlt durch Benutzung eines mit 2-Propanol befüllten Mr. Frosty™ Gefrierbehälters (Nalgene® / Thermo Fisher Scientific). Nach Erreichen von -80 °C wurden die Gefäße in einen Tank mit flüssigem Stickstoff zur langfristigen Lagerung transferiert.

Um das Auftreten unerwünschter Effekte der langfristigen Kultivierung, wie zum Beispiel spontaner Veränderungen des Erbguts zu minimieren, wurden Zellen regelmäßig frisch aufgetaut. Dafür wurde die Zellsuspension möglichst zügig unter Hinzugabe von 2 ml warmen Vollmediums aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß übertragen. Bei 100x g wurde für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Nun konnte die Suspension auf eine neue Zellkulturplatte zur Kultivierung übertragen werden.

3.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Für verschiedene Experimente mussten eine bestimmte Anzahl an Zellen ausgesät werden.

Dies konnte durch Verwendung des Z2 Coulter® Partikel-Zähler und Größe-Analysators (Beckman Coulter, Inc.) nach Protokoll des Herstellers erfolgen. Dafür wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml isotoner Lösung gut vermischt und anschließend in das Gerät gestellt. Zur Bestimmung der Zellzahl für das anschließende Aussäen von Einzelzellklonen erfolgte das Auszählen alternativ in einer Neubauer-*improved* Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG). Dies war ein spezieller Objektträger mit orthogonal kreuzenden Linien, auf das ein Deckglas unter Beachtung des Auftretens Newtonscher Ringe angehaftet wurde. Etwa 15 µl Zellsuspension wurden zwischen Objektträger und Deckglas aufgetragen und anschließend wurden die Eckquadrate ausgezählt. Das Volumen dieser Eckquadrate ist definiert als 0,1 µl. So ergibt sich zur Bestimmung der Zellzahl pro ml die Formel:

$$\text{Zellzahl } n \left(\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Zellzahl im Eckquadrat} * 10.000}{\text{Anzahl ausgezählter Eckquadrate}}$$

3.1.5. Generierung von Einzelzellklonen durch Grenzverdünnung

Um aus einem polyklonalen Pool an Zellen monoklonale Einzelzellklone generieren zu können, wurde eine Aussaat per Grenzverdünnung durchgeführt. Dafür wurde eine Zellsuspension in mehreren Einzelschritten auf 5 Zellen / ml verdünnt. 100 µl pro Well von diesem Gemisch wurde dann auf 96-well-Zellkulturplatten aufgetragen, wodurch mathematisch 0,5 Zellen pro Well ausgesät wurden. Nach 7 Tagen wurden alle Wells unter dem Mikroskop analysiert. Wells mit genau einer Kolonie wurden markiert und konnten für weitere Experimente verwendet werden. Wells ohne Kolonie oder mit mehr als einer Kolonie wurden von der Versuchsreihe ausgeschlossen.

3.1.6. Transfektion unter Verwendung von Lipofectamine® 2000

Für eine Transfektion eines Vektors in Zellen wurden zunächst 200.000 Zellen für H460 bzw. 250.000 Zellen für HCT116 auf 6-well-Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Vollmedium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mit RPMI bzw. DMEM + 10 % (v/v) FBS versetzt.

Folgender Reaktionsansatz wurde unter Verwendung von Lipofectamine® 2000 (Invitrogen™ / Thermo Fisher Scientific) vorbereitet:

Reaktionsgefäß	Reaktionsansatz
Gefäß 1	200 µl OptiMEM™ + 5 µl Lipofectamine® 2000
Gefäß 2	200 µl OptiMEM™ + 2,5 µg Vektor

Gefäß 2 wurde nun in Gefäß 1 übertragen und gut gemischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch tröpfchenweise auf ein Well der Zellkulturschale gegeben. Dann wurde für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und ein Mediumwechsel auf Vollmedium durchgeführt.

Für das R175-*Library*-Experiment wurden 4×10^6 H460-Zellen auf eine 10 cm-Schale ausgesät. Nach dem zuvor beschriebenen Verfahren lief die Transfektion unter Verwendung des folgenden Reaktionsansatzes ab:

Reaktionsgefäß	Reaktionsansatz R175- <i>Library</i>
Gefäß 1	1 ml OptiMEM™ + 23 µl Lipofectamine® 2000
Gefäß 2	1 ml OptiMEM™ + 12,5 µg Vektor

Ab dem 3. Tag nach der Transfektion wurde eine 3-tägige Selektion mit dem passenden Antibiotikum begonnen. Die folgenden Antibiotika wurden verwendet:

Antibiotikum	Konzentration	Selektionsdauer
Puromycin	1 µg/ml	3 oder 7 Tage
Hygromycin B	200 µg/ml	3 Tage

3.1.7. Knockdown von p53 durch siRNA-Transfektion

Zum Nachweis einer p53-spezifischen Bande im Western Blot nach *Base Editor* Transfektion wurde ein *Knockdown* durch siRNAs durchgeführt.

500.000 Zellen wurden in eine 6 cm-Zellkulturschale für siRNAs und in eine 6 cm Schale für nsiRNA-Kontrolle ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS und gewaschen und zu 4 ml Vollmedium gewechselt. Folgender Reaktionsansatz wurde vorbereitet:

Reaktionsgefäß	Reaktionsansatz
Gefäß 1	300 µl OptiMEM™ + 10 µl Lipofectamine® RNAiMAX
Gefäß 2	300 µl OptiMEM™ + 20 µM siRNA bzw. nsiRNA

Die siRNAs mit der AG Stiewe-internen Nummer #284, #286 und #287 wurden vermischt und anschließend verwendet. Als nsiRNA diente #153. Nun wurde der Inhalt von Gefäß 2 in Gefäß 1 appliziert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen appliziert und für 3 Tage inkubiert. Dann wurden Lysate generiert und ein Western Blot durchgeführt (s. 3.3.1).

3.1.8. Adenovirale Infektion

Um aus transfizierten *TP53-Knockout*-Zellen wieder aktiv exprimierende Zellen zu generieren, wurde die eingefügte LSL-Kassette durch eine Cre-Recombinase herausgeschnitten (Anton und Graham 1995). Dies geschah durch einen adenoviralen Vektor, der die Cre-Recombinase über einen CMV-Promoter exprimierte (ViraQuest, Inc.).

Zunächst wurden 200.000 Zellen (H460) auf eine 6-well Zellkulturschale ausgesät. Bei der *R175-Library* wurden 1×10^6 Zellen auf eine 6 cm-Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium zu 0,84 ml auf 6-Well-Schalen bzw. 2,1 ml auf 6 cm-Schalen RPMI-Leermedium + 2 % (v/v) FBS gewechselt. Die Menge an notwendigem Adenovirus ist unter Anderem abhängig von der Multiplizität der Infektion (*Multiplicity of Infection*, MOI), also dem Verhältnis von Viruspartikeln zu den infizierten Zellen. Die notwendige Virusmenge wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Notwendige Virusmenge (}\mu\text{l)} = \frac{\text{Zellzahl} * \text{MOI}}{\text{Virustiter}}$$

Der Virustiter war durch den Hersteller bekannt und lag bei 4×10^7 . Als MOI wurde für die H460-Zellen 250 festgelegt. Die berechnete Menge an Virus wurde dann 1:10 in 10 % (v/v) Glycerol in PBS verdünnt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Probe dann langsam auf die Zellen appliziert. Die Zellen wurden für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert unter vorsichtigem Schwenken alle 15 min. Anschließend wurden 1,16 ml Vollmedium auf 6-Well-Platten bzw. 2,9 ml auf 6 cm-Platten gegeben. Nach 24 h Inkubation unter zuvor beschriebenen Bedingungen wurde ein Mediumwechsel zu frischem Vollmedium durchgeführt. Der Erfolg der adenoviralen Infektion wurde durch Durchflusszytometrie (s. 3.1.10) kontrolliert.

3.1.9. Kolonieformationstest (CFA)

Zur Visualisierung der Resistenz oder Sensitivität von Zellen gegen bestimmte medikamentöse Behandlungen wurde ein Kolonieformationstest (*colony formation assay*, CFA) durchgeführt. Dafür wurde eine bestimmte Zellzahl (100.000 HCT116-Zellen bzw. 75.000 H460-Zellen) je in doppelter Ausführung auf 6 cm-Zellkulturschalen

ausgesät. Dem verwendeten Vollmedium wurden 10 μ M Nutlin-3a oder 1 μ g/ml Puromycin hinzugefügt, als Kontrolle wurden stattdessen 10 μ M DMSO in Vollmedium verwendet. Das Medium wurde jeden zweiten Tag in zuvor beschriebener Weise gewechselt. Nach einer Gesamtinkubation von 7-9 Tagen bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 70 % (v/v) Ethanol fixiert. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde das Ethanol abgesaugt und die Platten offen unter dem Abzug für 15 min getrocknet. Dann wurden die Zellen mit 5 ml Kristallviolett für 30 min gefärbt. Anschließend wurde das Kristallviolett entfernt und die Platten in filtriertem Wasser gewaschen. Nach Trocknung der Platten wurden sie gescannt.

3.1.10. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) dient der Messung von Parametern wie Granularität, Größe oder Fluoreszenz von Zellen (Hulett et al. 1969). Hier sollte der Anteil GFP-fluoreszierender Zellen nach Transfektion oder Infektion bestimmt werden, um dadurch auf die Effizienz des jeweiligen Verfahrens rückschließen zu können. Dafür wurden die Zellen durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt. GFP mit Emissionsmaximum bei 509 nm konnte durch einen passenden Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) Filter von 530/30 nm detektiert werden. Zunächst wurden die Zellen von der Zellkulturplatte geerntet (s. 3.1.2). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 500 μ l DPBS gewaschen und bei 100x g 5 min zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen wurde das Zellpellet in 350 μ l DPBS resuspendiert und in ein neues Reaktionsröhrchen übertragen. Die Messung erfolgte durch den BD Accuri™ C6 plus *flow cytometer* (Becton Dickinson GmbH) und die Auswertung durch FlowJo® (FlowJo, LLC; Becton Dickinson GmbH).

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Isolation von genomischer DNA

Zur Analyse von genomischer DNA (gDNA) musste diese aus den Zellen isoliert werden. Nach Ernten des Zellpellets (s. 3.1.2) wurde die gDNA mithilfe des QiaAMP® DNA Blood Mini Kits (QIAGEN N.V.) nach beigelegtem Standardprotokoll isoliert und in 25-50 µl H₂O eluiert.

Für ein PCR-Screening einer 96-well-Platte zur Prüfung des richtigen Einbaus der LSL-Kassette in die H460-Zellen wurde die Zellsuspension zunächst in eine neue 96-well-Platte mit konischem Boden übertragen. Die Zellen wurden bei 300x g für 5 min herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 100 µl PBND-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 55 °C für 60 min lysiert. Durch Denaturieren der Proteinase K bei 95 °C für 10 min wurde die Lyse gestoppt. Die Platte wurde gevortext und erneut zentrifugiert bei 300 g für 5 min. 1 µl des generierten Überstands konnte nun für PCR-Reaktionen verwendet werden.

3.2.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente wurde eine PCR durchgeführt. Die einzelnen folgenden Komponenten wurden auf Eis pipettiert. Die Zyklen wurden durch den MasterCycler® Pro *Thermocycler* (Eppendorf AG) abgewickelt. Anschließend wurden 10 µl der Probe mit 5 µl 6x Ladepuffer (NewEngland Biolabs) vermischt und auf ein Gel aufgetragen (s. 3.2.3).

Polyklonales Upstream-Screening der LSL-Kassette

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 13931	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 13934	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	70 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 2:20 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

Polyklonales Downstream-Screening der LSL-Kassette

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 7776	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 6535	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	62 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 1:35 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

Screening der LSL-Kassette im 96-well-Format Upstream

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
1 µl gDNA	
0,5 µl 10 µM vorwärts Primer 13931	95 °C 2:00 min
0,5 µl 10 µM rückwärts Primer 13934	95 °C 0:30 min
0,5 µl DMSO	70 °C 0:30 min
2 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 2:20 min
0,2 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,1 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 10 µl H ₂ O	

Screening der LSL-Kassette im 96-well-Format Downstream

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
1 µl gDNA	
0,5 µl 10 µM vorwärts Primer 7776	95 °C 2:00 min
0,5 µl 10 µM rückwärts Primer 6535	95 °C 0:30 min
0,5 µl DMSO	62 °C 0:30 min
2 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 1:35 min
0,2 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,1 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 10 µl H ₂ O	

Validierung der *Indels* im Puromycin-Gen der LSL-Kassette

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 13933	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 10152	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	63 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 2:25 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

Amplifizierung der gDNA zur TOPO-Klonierung von Intron 3 – Exon 6

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 9972	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 10875	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	66,5 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 1:25 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

Amplifizierung der gDNA zur TOPO-Klonierung von Intron 4 – Intron 6

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 736	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 6558	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	63,5 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 0:36 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

Amplifizierung generierter cDNA von Exon 2 – Exon 11

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 1384	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 1080	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	63 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 1:15 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

PCR-Präparation der R175-Library-Proben nach Cre-Rekombination für NGS

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 5 µM vorwärts Primer 10255	95 °C 2:00 min
1 µl 5 µM rückwärts Primer 6535	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	59 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 0:30 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

Geschachtelte PCR der R175-Library Proben für NGS

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
1 µl 1:500 verdünntes aufgereinigtes Amplikon	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 9624	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 10540/10541/ 10542	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	66 °C 0:30 min
1 µl Promega 25 mM MgCl ₂	72 °C 0:30 min
2 µl Promega 10x Mg-freier Reaktionspuffer	72 °C 5:00 min
0,1 µl dNTPs	4 °C hold
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	
ad 20 µl H ₂ O	

Base Editing große PCR Intron 5 bis Intron 9

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 14030	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 3488	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	65,5 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 1:40 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

Base Editing geschachtelte PCR Exon 8

Pipettier-Protokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
1 µl 10 µM vorwärts Primer 14026/14027	95 °C 2:00 min
1 µl 10 µM rückwärts Primer 14029/14028	95 °C 0:30 min
1 µl DMSO	64 °C 0:30 min
4 µl Promega 5x Reaktionspuffer	72 °C 0:20 min
0,4 µl dNTPs	72 °C 5:00 min
0,2 µl Promega GoTaq® DNA-Polymerase	4 °C hold
ad 20 µl H ₂ O	

3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Um unterschiedliche DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, wurden sie auf ein Gel aufgetragen. Hierfür wurde 1 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer unter Erhitzung gelöst. Anschließend wurde RedSafe™ in 1:4.000 Verdünnung hinzugegeben und vermischt. Das flüssige Gel wurde in eine Halterung mit passendem Kamm gefüllt. Nach Erkalten des Gels wurde es in eine Gelkammer transferiert. Nun konnten die Proben, vermischt mit 6x Ladepuffer (NewEngland Biolabs) in die Gelkammern aufgetragen werden. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurden als Marker 5 µl GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Unter Anlegen einer Gleichspannung von 80-120 V für 30-45 min wurden die Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Die Banden wurden nun mithilfe des INTAS UV-Transilluminators (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) analysiert.

3.2.4. Digitale PCR

Mithilfe einer digitalen PCR (dPCR) kann die absolute Anzahl bestimmter Zielgene bestimmt werden (Sykes et al. 1992). Dies geschieht durch Aufteilung der DNA in tausende einzelne Reaktionsgefäße, die alle jeweils einzeln durch PCR amplifiziert werden. Durch diese extreme Verdünnung enthalten einige Wells entweder das zu amplifizierende Produkt (positiv) oder sie enthalten es nicht (negativ). Somit entsteht ein digitales Ergebnis. Die Anzahl an positiven Reaktionen gegenübergestellt mit negativen Reaktionen erlaubt einen Rückschluss auf die absolute Häufigkeit des Zielgens in der Probe. Der hier durchgeführte Kopienzahlvariations-*Assay* vergleicht die Anzahl an Allelen von einem Referenzgen mit einem Zielgen von Interesse (McCord 2016). Dadurch, dass die Anzahl an Allelen des Referenzgens bekannt ist, kann in Abhängigkeit davon die Anzahl genomischer Loci des Zielgens quantifiziert werden. Hier wurde dies für die Bestimmung der Anzahl an GFP-Allelen in Abhängigkeit von RNase P-Allelen durchgeführt.

Nach Pipettieren der Proben (s. Tabelle unten) wurde ein QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K Chip V2 (Applied Biosystems™) in den QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Loader (Applied Biosystems™) eingesetzt. Nach Standardprotokoll wurde die gesamte Probe in die Ladevorrichtung (QuantStudio™ 3D Digital PCR Sample Loading Blades, Applied Biosystems™) aufgetragen und der Chip beladen. Nach Abschluss des Beladevorgangs wurde die Chipinnenfläche mit Immersionsflüssigkeit befüllt und mit einem QuantStudio™ 3D Digital PCR Chip Lid V2 (Applied Biosystems) verschlossen. Anschließend wurden die Proben im GeneAmp® Thermocycler (Applied Biosystems) nach folgendem Protokoll amplifiziert:

dPCR -Pipettierprotokoll	Protokoll des Thermocyclers
150 ng gDNA	
0,75 µl TaqMan® Copy Number_GFP_seq_assay (<i>Custom-Design</i> , Applied Biosystems)	96 °C 10:00 min
0,75 µl RNase P, human (Applied Biosystems)	60 °C 2:00 min
7,5 µl QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix v2 (Applied Biosystems)	98 °C 0:30 min
Ad 15 µl H ₂ O	60 °C 2:00 min
	10 °C hold

Danach konnten die Chips durch das QuantStudio™ 3D Digital PCR Instrument (Applied

Biosystems™) analysiert werden. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe des Programms QuantStudio™ 3D AnalysisSuite™ Cloud Software.

3.2.5. Totale RNA-Isolation

Nach Ernten der Zellen (s. 3.1.2) wurde das Zellpellet direkt in 600 µl RLT-Puffer suspendiert. Die anschließende totale RNA-Isolation erfolgte mithilfe des RNeasy® Mini Kits (QIAGEN N.V.) und dem QIAcube® (QIAGEN N.V.) nach Protokoll des Herstellers. Zur Minimierung von DNA-Resten in der isolierten RNA-Probe erfolgte der optionale DNA-Verdau durch RNase-freie DNase (QIAGEN N.V.).

Alternativ wurde die RNA mithilfe des Monarch® Total RNA Miniprep Kits (New England Biolabs GmbH) nach Protokoll des Herstellers isoliert.

Die RNA wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration mithilfe des NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt (s. 3.2.14). Die generierte RNA wurde bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

3.2.6. Generierung von cDNA

Zur Synthese von cDNA wurde das SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet und anhand des folgenden Protokolls generiert:

cDNA-Pipettierprotokoll	Protokoll des <i>Thermocyclers</i>
500 ng RNA	25 °C 10 min
1 µl 10 x SuperScript™ Enzyme Mix	42 °C 90 min
2 µl 5 x VILO™ Reaction Mix	85 °C 5 min
Ad 10 µl RNase-freies H ₂ O	4 °C hold

Bis zur weiteren Nutzung wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

3.2.7. Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative PCR dient zur Bestimmung relativer Genexpression eines Zielgens in Bezug auf ein Vergleichsgen (Higuchi et al. 1993). Hierzu wurde das fluoreszierende Molekül SYBR-Green verwendet, das in die DNA interkaliert. Am Ende jedes Zyklus wurde die Fluoreszenzstärke des SYBR-Greens durch den LightCycler® 480 (Roche Molecular Systems, Inc.) gemessen. Dies ergab einen Rückschluss auf die Menge des amplifizierten DNA-Fragments. Unter Verwendung des ABSolute qPCR Mix (Thermo Fisher Scientific) wurde das Pipettieren vom Microlab® STARlet Hamilton *liquid handling system* (Hamilton Company) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

qPCR-Pipettierprotokoll	Protokoll des LightCyclers
7.5ng cDNA	95 °C 15min
1 µl 2 µM vorwärts Primer	95 °C 0:15min
1 µl 2 µM rückwärts Primer	60 °C 0:20min
5 µl ABSolute qPCR Mix	72 °C 0:20min
Ad 10 µl H ₂ O	Schmelzkurve: 60 – 95 °C (1.5 °C/sek)

In dieser Forschungsarbeit wurde die Genexpression von *CDKN1A* (p21) und *TP53* (p53) in Bezug auf das Vergleichsgen *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) analysiert. Die Daten wurden anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet (Livak und Schmittgen 2001).

3.2.8. Golden-Gate-Klonierung

Durch Verwendung von sogenannten IIS-Restriktionsenzymen konnten in das Rückgrat eines bestehenden Plasmids zusätzliche Sequenzen eingefügt werden (Engler et al. 2008). Die verwendeten Enzyme BbsI und BsaI haben außerhalb ihrer Erkennungssequenz geschnitten. Hierdurch ist nur eine einmalige Restriktion möglich, wodurch verhindert wird, dass z.B. die gleiche Sequenz mehrmals hintereinander eingefügt werden kann. Nach Restriktion entsteht ein vier Basenpaar langer Überhang. Die eingefügte Sequenz bestand aus zwei komplementären Oligonukleotiden (Oligos), die an ihrem jeweiligen 5'-Ende den erwähnten Überhang besaßen. Durch folgendes Protokoll wurden die Oligonukleotide aneinander gebunden (*Annealing*):

Oligonukleotid- <i>Annealing</i> -Pipettierprotokoll	Protokoll des Thermocyclers
2 µl 10 µM vorwärts Oligonukleotid 2 µl 10 µM rückwärts Oligonukleotid 16 µl <i>Annealing</i> Puffer	95 °C - 5 min Abkühlen auf 21 °C (1 °C / min)

Die aneinander gebundenen (*annealed*) Oligonukleotide konnten nun durch die bereits genannten Restriktionsenzyme mit anschließender Ligation durch eine Ligase in das gewünschte Plasmid eingebaut werden.

Golden-Gate-Pipettierprotokoll (BbsI)	Protokoll des <i>Thermocyclers</i>
2.5 µl <i>annealed</i> Oligonukleotide 2 µl 10x NEBuffer™ 2.1 1 µg Vektor 1 µl 10.000 U/ml BbsI 0.5 µl 40.000 U/ml T4 DNA-Ligase 1 µl 10 mM ATP 1 µl 100 mM DTT ad 20 µl Reinstwasser	37 °C 2 min } 20 °C 5 min } x50 65 °C 20 min 4 °C hold

Golden-Gate-Pipettierprotokoll (BsaI)	Protokoll des Thermocyclers
2.5 µl <i>annealed</i> Oligonukleotide 2 µl 10x CutSmart NEBuffer™ 1 µg Vektor 1 µl 10.000 U/ml BsaI 0.5 µl 40.000 U/ml T4 DNA-Ligase 1 µl 10 mM ATP 1 µl 100 mM DTT ad 20 µl Reinstwasser	37 °C 2 min } 20 °C 5 min } x50 65 °C 20 min 4 °C hold

3.2.9. Elektrotransformation von Bakterien

Der Aufbau eines kurzzeitigen elektrischen Felds führt zur Aufnahme von Plasmiden in Bakterien wie *E. coli* (Fiedler und Wirth 1988). Die Produkte der Klonierung aus 3.2.8 können so durch Bakterienkultivierung amplifiziert werden. Dafür wurden 50 µl von elektrokompetenten *Escherichia coli*-Bakterien (DH10B) langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 2 µl des Klonierungsprodukts dazugegeben und die Mischung wurde in Elektroporations-Küvetten überführt. Durch den MicroPulser™ Elektroporations-

Apparat (Bio-Rad Laboratories, Inc.) wurde für etwa 5 ms eine elektrische Spannung von 1,8kV angelegt. Anschließend wurden die Bakterien in 500 µl LB-Medium übertragen und bei 37 °C und 300 rpm in einem horizontalen Schüttler für 30-45 Minuten inkubiert. Nun wurden 150 µl des Gemischs auf eine Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde mit 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin versetzt, je nach Resistenzgen des klonierten Vektors.

3.2.10. Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)

Einzelne Kolonien aus 3.2.9 wurden mit autoklavierten Zahnstochern gepickt und in 5 ml LB-Medium + je nach Resistenz 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C und 300 rpm für 8-12 h inkubiert. Anschließend wurden 2 ml des Gemischs in ein Reaktionsgefäß übertragen und bei 5000 rpm und 20 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt, das Pellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur und 1000 rpm für 3 min in einem Horizontalschüttler inkubiert. Die Lyse erfolgte durch Hinzugabe von 300 µl P2-Puffer und 3-maligem Invertieren mit darauffolgender 5 min Inkubation auf Eis. Dann wurden 300 µl P3-Puffer zur Neutralisation hinzugegeben und nach erneutem Invertieren wurden die Proben bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und mit 700 µl Isopropanol durch Vortexen vermischt. Das Gemisch wurde dann bei 13.000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut bei 13.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets bei 37 °C für 5 min getrocknet. Dann wurde 50 µl H₂O hinzugegeben und im Horizontalschüttler bei 1000 rpm und 37 °C für 30 min vermischt. Die Plasmid-DNA wurde per Kontrollverdau (s. 3.2.12) oder Sanger-Sequenzierung (s. 3.2.15) analysiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.11. Präparation von Plasmid-DNA in mittlerem Maßstab (Midi-Präp)

Nach Kontrolle des Vorliegens des gewünschten Produkts der Mini aus 3.2.10 konnte dieses nun durch Durchführung einer Midi in größerem Maßstab vervielfältigt werden. Dafür wurden die übrigen 3 ml an LB-Medium + Bakterien aus 3.2.9 in einen Reagenzkolben mit 100 ml LB-Medium + je nach Resistenz 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin vermischt. Dies wurde dann über Nacht bei 37 °C und 300 rpm

inkubiert. Die Midi-Präparation erfolgte anschließend mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) nach Protokoll des Herstellers. Das DNA-Pellet wurde am Ende in 100-200 µl H₂O resuspendiert. Die Konzentration wurde durch den NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) bestimmt (s. 3.2.14). Die Richtigkeit der DNA-Sequenz wurde durch Sanger-Sequenzierung validiert (s. 3.2.15).

3.2.12. Kontrollverdau von Plasmid-DNA

Der Kontrollverdau wurde unter Verwendung passender Restriktionsenzyme nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Kontrollverdau Pipettierprotokoll (BsaI)	Inkubation
500 ng Plasmid-DNA 0,1 µl Restriktionsenzym 1 µl zu Enzym passender Puffer Ad 10 µl reines Wasser	37 °C 1 h

Anschließend wurden die Proben durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.3) ausgewertet.

3.2.13. TOPO-Klonierung

Die TOPO-Klonierung durch das TOPO TA *Cloning* Kit für Subklonierung (Thermo Fisher Scientific) wurde verwendet, um nach einer PCR verschiedene amplifizierte Allele einzeln darstellen zu können. Hierfür wurden 4 µl des PCR-Amplicons + 1 µl 1:4 verdünnte Salzlösung (Thermo Fisher Scientific) + 1 µl pCR®2.1-TOPO®-Vektor (Thermo Fisher Scientific) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte der Vektor dann durch Elektrottransformation und Mini-Präparation (s. 3.2.10) in Bakterien vervielfältigt und aufgereinigt werden. In einer Sanger-Sequenzierung der Mini-Präparationen konnten so die Sequenzen einzelner Allele sauber abgebildet werden.

3.2.14. Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Alle Konzentrationsbestimmungen von DNA- und RNA-Proben erfolgten durch das NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) nach Protokoll des Herstellers. Dafür wurden 1,5 µl der Probe aufgetragen und die Konzentration durch die Absorption bei 260nm berechnet. Als Blindwert wurden 1,5 µl RNase-freies Wasser verwendet. Die Qualität der Proben wurde über den Quotienten der Absorption bei 280nm zu 260nm bestimmt. Ein Quotient von 1,8 ließ auf eine gute Reinheit der Probe zurückschließen (Hauk 2013).

3.2.15. Sanger-Sequenzierung

Um die richtige Sequenz von generierten Vektoren oder das Vorliegen bestimmter Mutationen in DNA oder RNA zu verifizieren, wurden die Proben zur Sanger-Sequenzierung (Sanger et al. 1977) eingeschickt. Sie wurde ausgeführt von der LGC Genomics GmbH und die Ergebnisse wurden durch das Programm Benchling (Benchling, Inc.) ausgewertet. Die Auswertung der induzierten Insertionen oder Deletionen (*Indel*) in den *TP53-Knockout*-Einzelzellklonen erfolgte durch ICE-Analyse (*Inference of CRISPR Edits*; Synthego) (Hsiau et al. 2018).

3.2.16. Next Generation Sequencing

Zur Charakterisierung der *R175-Library* wurde entsprechende gDNA in der Next Generation Sequencing (NGS) Technik „*sequencing by synthesis*“ (Illumina, Inc.) verwendet. Die Zellen wurden zunächst für 10 Tage mit 10 µM Nutlin-3a oder DMSO als Kontrolle behandelt. Dabei erfolgte ein Mediumwechsel an jedem 3. Tag. Anschließend wurde genomische DNA isoliert (s. 3.2.1). Diese wurde dann durch eine geschachtelte PCR amplifiziert (s. 3.2.2). Es erfolgte eine Analyse der Amplikon-Länge sowie der Konzentration durch den QIAxcel® (QIAGEN N.V.). Die Proben wurden nun durch Verwendung der Konzentrationswerte des QIAxcel® äquimolar gepoolt. Die Vorbereitung für das NGS erfolgte durch Dr. A. Nist, G. Filmer und A. Schneider, Core Facility, Philipps-Universität Marburg. Hierbei wurde das MiSeq v2 Nano Reagenzkit mit 2x250 bp gepaarten Läufen (Illumina, Inc.) verwendet. Die anschließende bioinformatische Auswertung erfolgte durch K. Humpert, M.Sc., AG Stiewe.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Generierung von Protein-Lysaten

Zur Analyse bestimmter Proteine per Western Blot wurden Lysate von Zellen generiert. Nach Ernten eines Zellpellets wurde dieses abhängig von seiner Größe in 25-50 µl NP-40 Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse fand durch 5 Zyklen à 30 Sekunden Sonifizierung (Diagenode, Inc.) statt. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann 30 min bei 17.000x g und 4 °C zentrifugiert. Nun wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.2. Messung der Proteinkonzentration

Um von jeder Probe exakt gleich viel Menge an Gesamtprotein aufzutragen, wurde die Konzentration per Bradford-Messung bestimmt (Bradford 1976). *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad Laboratories, Inc.) wurde 1:5 in PBS verdünnt. 1 ml dieser Flüssigkeit wurde mit 1 µl Protein Lysat vermischt. Als Blindwertmessung wurde 1 µl NP-40 Lysepuffer verwendet. Anschließend wurde in Duplikaten die Absorption bei 595nm durch das BioPhotometer® 6131 Spektrophotometer (Eppendorf AG) gemessen. Durch Verwenden einer BSA Standard Kurve (1 – 16 µg/ µl), die unter denselben Bedingungen bestimmt wurde, konnte so die Proteinkonzentration berechnet werden.

3.3.3. *Sodium*-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde eine *Sodium*-Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt, um die Proteine der Molekularmasse nach aufzutrennen (Laemmli 1970). Dafür wurden die Proben zunächst nach folgendem Protokoll präpariert:

Proteinlysate-Pipettierprotokoll	Inkubation
20 µg Proteinlysate 6,25 µl 4x NuPAGE™ LDS Sample Buffer 2,5 µl 10x NuPAGE™ Sample Reducing Agent Ad 25 µl NP-40 Lysepuffer	70 °C 10 min

Für die Gelelektrophorese wurden vorgegossene NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris-Gele (Invitrogen™ / Thermo Fisher Scientific) verwendet. Diese wurden in die innere Kammer einer XCell4 SureLock™ Midi-Cell (Thermo Fisher Scientific) - Gelkammer gesetzt und mit Laufpuffer + 0,25 % (v/v) NuPAGE™ Antioxidans aufgefüllt. Die äußere Gelkammer wurde nun mit Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden alle Geltaschen gründlich gespült und die Proben wurden aufgetragen. Als Größenmarker wurden 4 µl des *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dann wurde ein Gleichspannung von 80 V für die ersten 15 min angestellt mit darauffolgenden 140 V für 75 min.

3.3.4. *Blotting* der aufgetragenen Proteine

Um später die aufgetrennten Proteine per Bildgebung analysieren zu können, mussten sie vom Gel auf eine Membran übertragen werden (Towbin et al. 1979). Es wurde das Tank-Blot Verfahren angewendet und eine Immun-Blot® PVDF Membran (Bio-Rad Laboratories, Inc.) verwendet, die zunächst 1 min in Methanol eingelegt wurde, um ihre Hydrophobie zu mindern. Dann wurde sie 3 min in gefiltertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und von *Blotting*-Papieren und Schwämmen flankiert. Das entstandene *Sandwich* wurde in eine *Blotting*-Kammer gestellt und diese mit Transferpuffer aufgefüllt. Das *Blotten* erfolgte bei 4 °C unter ständigem Rühren eines Magnetrührers (IKA) bei Gleichspannung von circa 3 mA/cm² Membran für etwa 1 min/kDa Molekülmasse des größten analysierten Proteins. Anschließend wurde die Membran in 5 % Magermilchpulver in TBS-T (im Folgenden 5 %ige Milch) für 1 h geblockt.

3.3.5. Auswertung per Immundetektion

Die verwendeten Primärantikörper wurden in 5 %iger Milch verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4 °C bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 5-mal für jeweils 5 min in TBS-T gewaschen. Anschließend wurde ein in 5 %iger Milch verdünnter Sekundärantikörper, der an eine Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, für 1 h bei auf der Membran inkubiert. Die Membran wurde wie zuvor beschrieben erneut gewaschen. Die Analyse der Proteine erfolgte mit dem WesternBright™ Sirius™ HRP Substrat (Advansta, Inc.) und dem ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Als Ladekontrolle wurde außerdem

das Aktin-Signal detektiert. Dies erfolgte durch Inkubation der Membran mit einer Mischung aus entsprechendem Primärantikörper und Sekundärantikörper Alexa-488 in 5 %iger Milch für 1 h. Nach zuvor beschriebenem Waschvorgang erfolgte die Auswertung durch das ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

4. Ergebnisse

4.1. Die erfolgreiche Etablierung von H460-Zellen mit zwei *TP53-Knockout*-Allelen und einem editierbaren LSL-Allel durch CRISPR/Cas9 und homologe Rekombination

4.1.1. Erfolgreiche Generierung des Donor-Vektors für CRISPR/Cas9 und homologe Rekombination

In parentale NCI-H460-Zellen sollte durch CRISPR/Cas9 und homologe Rekombination eine $\text{loxP-EF1}\alpha\text{-Pac-T2A-GFP-PolyA-STOP-loxP}$ (LSL)-Kassette in den endogenen *TP53* Genlokus eingebaut werden. Dafür wurde zunächst ein entsprechender *Targeting*-Vektor generiert, indem ein bereits existierender Vektor (HR700-PA+HA1_S+HA2_L_GoldenGate (interne Nummer: *F256*), generiert von J. Schneikert, AG Stiewe) modifiziert wurde. Dieser Vektor besitzt eine komplementäre Sequenz zum *TP53* Exon 4 bis Intron 6. Dazwischen ist zusätzlich die LSL-Kassette in Intron 4 eingefügt. Außerdem hat der Vektor eine zusätzliche Thymin-Base in Intron 5, was im späteren Verlauf die Verwendung einer spezifisch gegen diese Insertion gerichtete sgRNA erlaubt. Dadurch sollte das erneute Binden von dieser nach erfolgreicher homologer Rekombination des Allels verhindert werden. In Exon 5 wurde nun durch Golden Gate-Klonierung eine Sequenz eingefügt, die der dortigen *TP53*-Wildtypsequenz entspricht, was bei dem zuvor bestehenden Vektor nicht der Fall war und hiermit korrigiert wurde. Dafür wurden zwei komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide zunächst hybridisiert, sodass ein kurzes dsDNA Fragment mit passenden Überhängen entstanden ist, das später in den Vektor eingefügt werden konnte. In einer Reaktion wurde dann die DNA durch das Restriktionsenzym BbsI geschnitten, das hybridisierte Oligonukleotid eingefügt und ligiert (Abbildung 11 A). Anschließend wurde der erfolgreiche Einbau des Oligonukleotids in den Vektor durch Sanger-Sequenzierung validiert (Abbildung 11 B, C). Der Vektor mit der verwendeten sgRNA px330 Intron5_sg7 (interne Nummer: *E829*) wurde bereits von S. Mutlu (AG Stiewe) generiert und getestet.

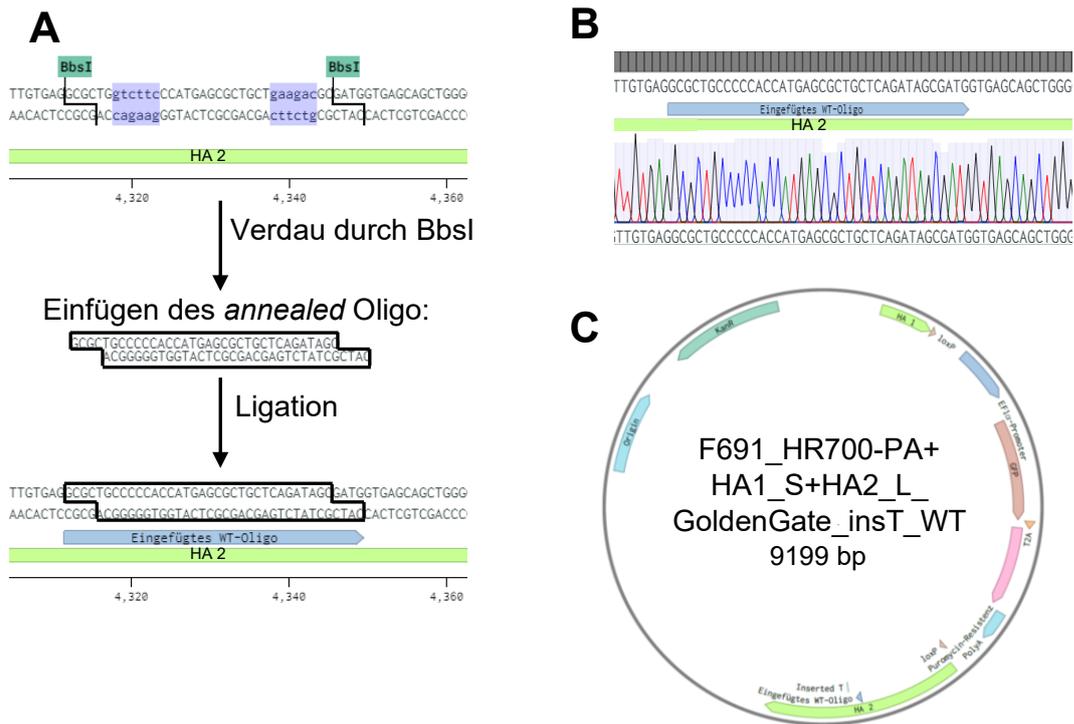


Abbildung 11: Generierung des Donor-Vektors HR700-PA-HA1_S+HA2_L_GoldenGate_insT_WT.

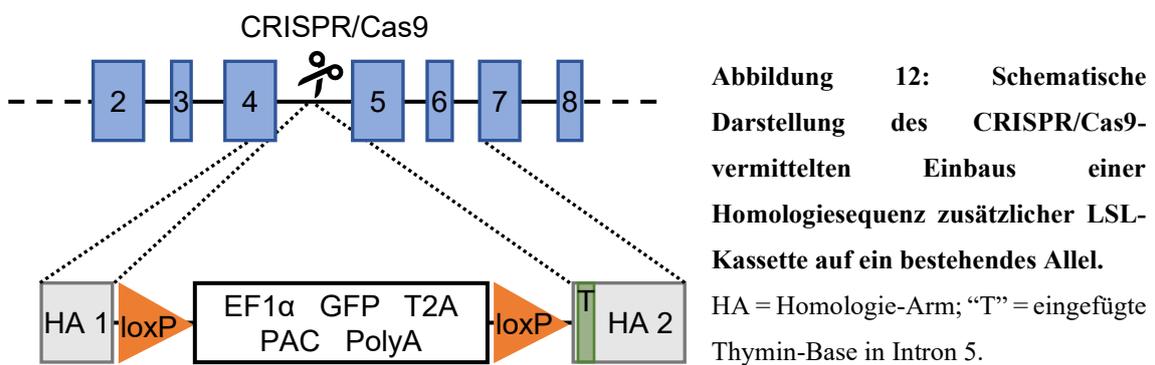
A: Schematische Darstellung des Einbaus eines Oligonukleotids mit Wildtyp (WT)-Sequenz in einen bestehenden Vektor. Dies wurde durch GoldenGate-Klonierung und Verwendung von 2 Schnittstellen des TypII-S-Restriktionsenzym *BbsI* erreicht. Anschließend konnte das *annealed* Oligonukleotid durch komplementäre Überhänge eingesetzt und ligiert werden.

B: Sanger-Sequenzierung des generierten Vektors zur Kontrolle des korrekten Einbaus des WT-Oligonukleotids.

C: Schematische Darstellung des generierten Vektors (F691), der für folgende Experimente verwendet werden konnte.

4.1.2. Generierte Einzelzellklone zeigen den Einbau von exakt einer LSL-Kassette im *TP53*-Lokus

Zunächst wurden Wildtyp -H460-Zellen mit dem *Targeting*-Vektor und der sgRNA aus 4.1.1 transfiziert (Abbildung 12). Ziel dieser initialen Transfektion war es, Zellen ohne exprimierendes p53 (*p53-knockout*-Zellen) zu generieren. Hierbei sollte eins der 3 Allele die LSL-Kassette tragen und durch das Stopp-Codon und das Polyadenylierungssignal kein p53 exprimieren. Die anderen beiden Allele sollten wegen des induzierten Doppelstrangbruchs NHEJ-bedingte *Indels* erhalten, die ebenfalls zu einem *Knockout* von p53 führen.



Da die LSL-Kassette unter anderem ein *pac*-Gen besitzt, welches eine Resistenz gegen Puromycin vermittelt, wurden die Zellen anschließend für 7 Tage mit Puromycin selektioniert, um alle Zellen, die die LSL-Kassette nicht stabil integriert hatten, auszuschließen. Zur weiteren Selektion wurde der Mdm2-Inhibitor Nutlin-3a verwendet (Vassilev et al. 2004). Bei Interaktion von Mdm2 mit p53 kommt es zur Polyubiquitinierung und damit zum Abbau von Letzterem. Nutlin-3a behindert die Interaktion von Mdm2 und p53, sodass p53 in den Zellen stabilisiert wird und den Zellzyklus-Arrest einleitet (Weinberg 2014, S. 352–355). Zellen, die WT-p53 exprimieren, arretieren deshalb normalerweise unter Nutlin-3a-Behandlung. Bei *p53-Knockout*-Zellen sollte somit auch unter Inhibition von Mdm2 durch Nutlin-3a kein Zellzyklus-Arrest stattfinden. Dadurch wurden Zellen ausgeschlossen, die zwar den Vektor integriert hatten, jedoch weiterhin von einem oder mehreren *TP53*-Allelen aktiv p53 exprimierten.

Ausgehend von dem Puromycin- und Nutlin-3a-resistenten polyklonalen Zellpool wurden Einzelzellklone generiert. 96 Klone davon wurden mithilfe einer LSL-Allelspezifischen PCR untersucht (Abbildung 13 A). Dafür wurden zwei PCRs entworfen, die beide mit einem Primer in der LSL-Kassette binden und mit dem anderen Primer auf der

Sequenz von *TP53*, jedoch außerhalb des Homologie-Arms. Die eine PCR hat hierfür ihren vorwärts Primer in Intron 1 und den rückwärts Primer im GFP-Gen der LSL-Kassette. Die andere durchgeführte PCR amplifizierte den *Downstream*-Teil der LSL-Kassette mit vorwärts Primer in der loxP-Sequenz der LSL-Kassette und rückwärts Primer in Exon 7. Bei positivem Resultat in beiden PCRs ließ das die Schlussfolgerung zu, dass eine LSL-Kassette an der exakt richtigen Stelle im *TP53*-Gen vollständig eingebaut wurde und nicht etwa zufällig an einer anderen Stelle des Genoms. Die anschließende Auswertung zeigte 9 Einzelzellklone, die eine Bande in beiden PCRs hatten (Abbildung **13 B**). Das Vorliegen der LSL-Kassette dieser 9 Einzelzellklone wurde durch eine Analyse per Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS-Analyse) nochmals zusätzlich bestätigt (Abbildung **14 A**). Dafür wurde die ausgehende Fluoreszenz von dem aus der LSL-Kassette exprimierten GFP gemessen. Die GFP-Positivität betrug bei den sehr homogenen Peaks 99,3-99,9 %. Jedoch wurde der Einzelzellklon #H2 wegen unsauberem GFP-positivem Peak von den Experimenten ausgeschlossen.

Die 8 übrigen Einzelzellklone wurden nun weiter charakterisiert, indem ein Kopiezahlvariations (*Copy Number Variation*, CNV) -Test per digitaler PCR durchgeführt wurde, um die Anzahl an Allelen, die eine LSL-Kassette enthalten, zu quantifizieren. Nach Durchführung des CNV-Tests wurde die Anzahl genomischer Loci des GFP-Gens (und dadurch der LSL-Kassette) mit der Anzahl genomischer Loci des Referenzgens RNase P mit bekannter Kopienzahl gegenübergestellt, um so die absolute Kopienanzahl von GFP herauszufinden (Abbildung **14 B**). Als Kontrolle wurden HCT116^{ΔLSL}-Zellen verwendet, die eine GFP-Kopie enthalten. 5 der 7 der getesteten Einzelzellklone (#B4, #C6, #E8, #G9, #H9) zeigten hier eine Quantität von genau einem GFP-Allel und damit auch genau einer LSL-Kassette. Dies entspricht dem optimalen Ergebnis dieses Experiments, da es in Kombination mit der durchgeführten PCR aus Abbildung **13 B** bedeutet, dass diese eine LSL-Kassette an der genau richtigen Stelle im Genom eingebaut wurde und sich an anderen Stellen des Genoms keine weiteren LSL-Kassetten befinden. Der Einzelzellklon #E7 zeigte rechnerisch 1,5 LSL-Kassetten und wurde ebenfalls für weitere Experimente verwendet.

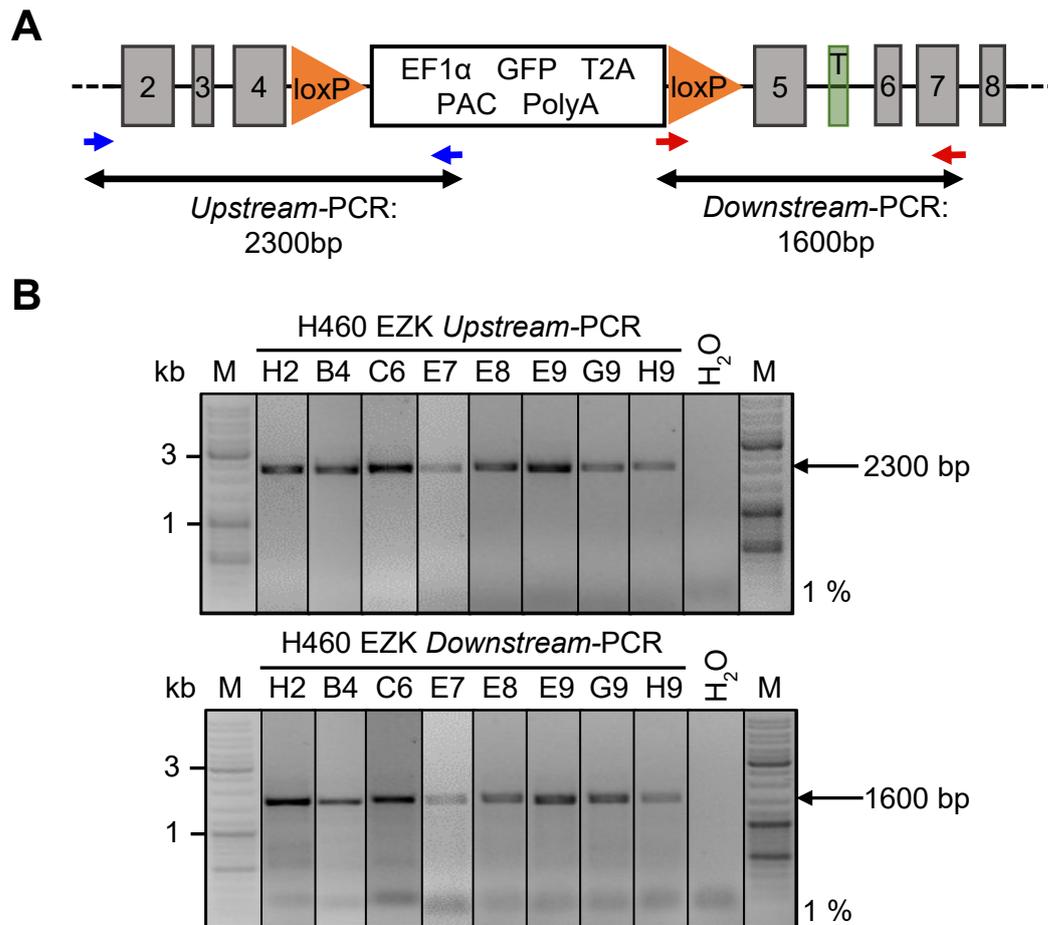


Abbildung 13: Generierte Einzelzellklone zeigten den Einbau von einer LSL-Kassette an der richtigen Stelle von *TP53*.

A: Schema des PCR-Designs zur Darstellung des LSL-Allels. Beide Primer-Paare bestehen aus einem Primer in der LSL-Kassette und einen Primer außerhalb des Homologie-Arms.

B: Alle PCR-positiven Einzelzellklone (EZK), zusammengefasst aus einem Screening von 96 Klonen. *Upstream* und *Downstream* bezieht sich auf das Schema von A. Die Bandenauffrennung erfolgte durch eine 1 %ige Agarose-Gelelektrophorese.

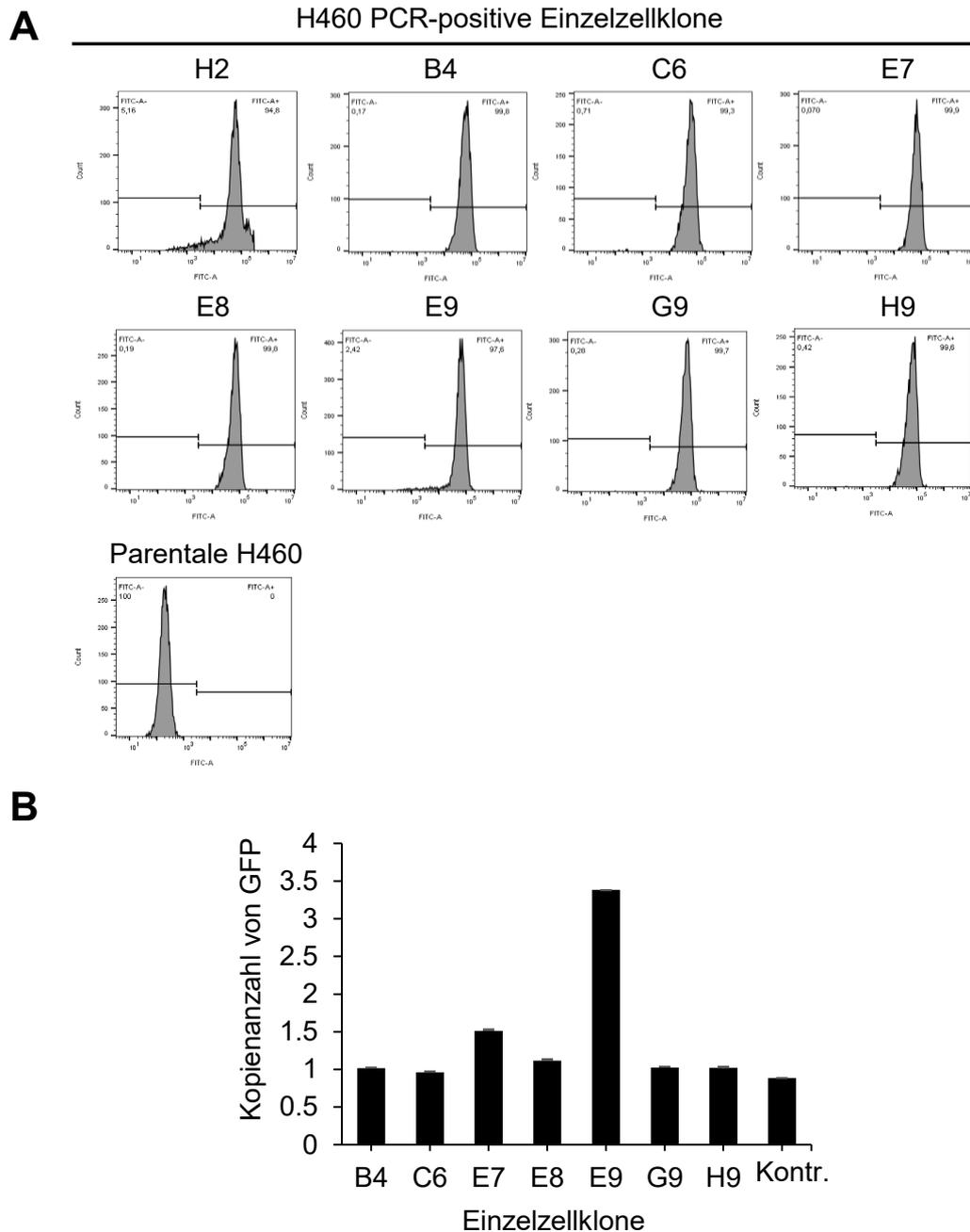


Abbildung 14: FACS und dPCR bestätigen, dass die LSL-Kassette einmalig im Genom eingebaut wurde.

A: Durchflusszytometrie aller PCR-positiven Einzelzellklone aus B. Filterung durch den FITC-Kanal. FITC-Positivität korreliert mit Expression von GFP. Die GFP-Expression wurde als Surrogat für das Existieren von LSL-Kassette(n) verwendet.

B: Kopienanzahlvariations-Assay aller PCR-positiven Einzelzellklone aus B durch Durchführung einer digitalen PCR. Die Berechnung der Kopienanzahl erfolgte durch den Quotienten aus FAMTM-Signalen zu Vic[®]-Signalen, multipliziert mit 3 für 3 H460 *TP53*-Allele. Eine Kopienanzahl von 1 entsprach genau einem Allel in der Zelle, das GFP exprimiert. Die angezeigte Standardabweichung wurde bereits durch QuantStudioTM 3D Digital PCR System (Applied BiosystemsTM) berechnet. Kontr. = HCT116^{ΔLSL}-Zellen.

4.1.3. **Zwei Deletionen auf den beiden anderen Allelen neben dem LSL-Allel der H460-Zellen bewirken ein *TP53-Knockout***

Die Kombination der vorigen Ergebnisse bedeutet, dass die beiden anderen *TP53*-Allele keine LSL-Kassette tragen, wegen der Nutlin-3a-Resistenz jedoch trotzdem *p53-Knockout* sind. Als Ursache dafür liegt das Entstehen von *Indels* durch Reparatur in Form von NHEJ nach dem Doppelstrangbruch durch Cas9 nahe (Le Cong et al. 2013), was durch folgende Experimente bestätigt werden sollte. Da die verwendete sgRNA dieser Transfektion auf eine Sequenz in Intron 5 zielt, wurde diese Region genauer charakterisiert. Dafür wurde zunächst eine PCR etabliert, die ihren vorwärts Primer *Upstream* des Homologie-Arms 1 hat und den rückwärts Primer *Downstream* des Homologie-Arms 2 (Abbildung 15 A). Die Elongations-Zeit während der PCR wurde dabei so kurz gehalten, dass das Allel mit der LSL-Kassette nicht amplifiziert wurde, was in einer Gelelektrophorese bestätigt wurde (Abbildung 15 B). Hier zeigten alle Proben die erwartete Bande bei 1438 bp und keine Bande bei 4218 bp, die auf das LSL-Allel hingedeutet hätte. Die Proben wurden anschließend mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Mithilfe einer ICE (*Inference of CRISPR Editing*)-Analyse (Synthego 2019) wurde das Muster induzierter Insertionen oder Deletionen um die Schnittstelle der sgRNA anhand der Sanger-Sequenzierungs-Daten ausgewertet. Überraschenderweise sah das generierte *Indel*-Diagramm für alle eingeschickten Klone gleich aus (Abbildung 15 C). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass alle Zellklone demselben Ursprungsklon entstammen. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf das weitere Vorgehen.

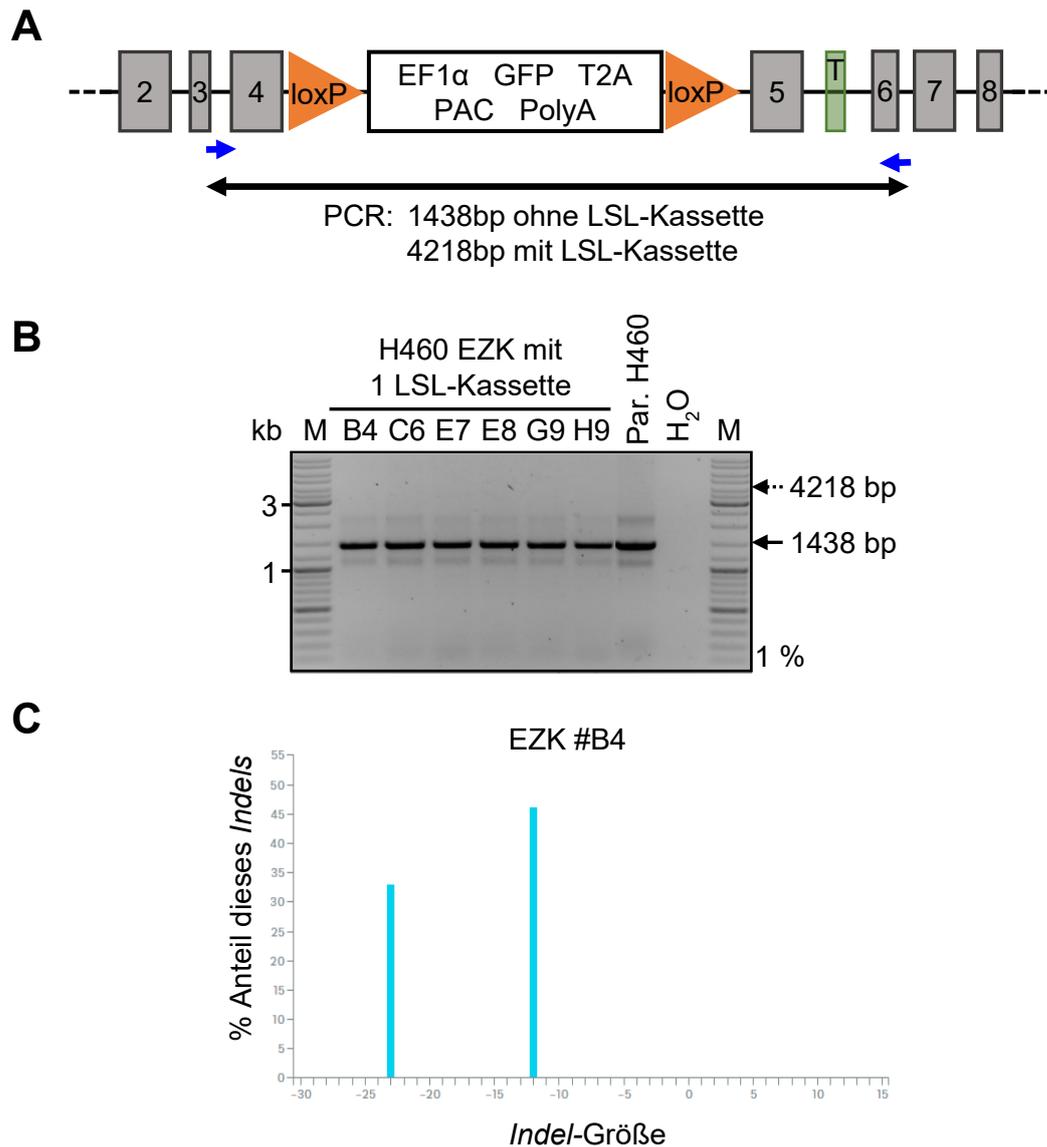


Abbildung 15: Charakterisierung der beiden *TP53*-Knockout-Allele der H460-Zellklone mittels PCR und ICE-Analyse.

A: Schematische Darstellung der durchgeführten PCR

B: Nach der PCR aufgetrennte Amplikons durch 1 %iger Agarose-Gelelektrophorese. Die angezeigten Bandengrößen korrelieren mit denen des Schemas aus **A**. Wenn das LSL-Allel amplifiziert worden wäre, wäre bei 4218 bp eine Bande sichtbar, was hier nicht der Fall war. Par. H460 = Parentale H460-Zellen

C: Indel-Graph der gemessenen Indel-Größe nach Sanger-Sequenzierung der Amplikons aus **B**. Die Analyse wurde durch das ICE-Analyse-Tool (Synthego®) durchgeführt. Exemplarisch wurde ein Einzelzellklon (EZK) dargestellt, repräsentativ für alle 6 analysierten EZKs.

Das *Indel*-Diagramm zeigte das Vorliegen zweier unterschiedlich großer Deletionen von 12 bp und 23 bp Größe. Um dies eindeutig den beiden *TP53*-Allelen zuordnen zu können, wurde anschließend exemplarisch von zwei dieser Klone eine erneute PCR durchgeführt, diesmal von Intron 4 bis Intron 6, wodurch auch das LSL-Kassetten tragende Allel (LSL-Allel) amplifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Dieses konnte später durch das eingefügte Thymin in Intron 5 (s. 4.1.1) klar von den anderen beiden Allelen unterschieden werden. Die 3 Allele wurden durch TOPO-Klonierung einzeln kloniert und sequenziert.

Durch anschließende Sanger-Sequenzierung konnten eindeutig alle drei Allele dargestellt werden. Dabei zeigte sich um die Schnittstelle der sgRNA herum eine 12 bp große Deletion des ersten Allels und eine 23 bp große Deletion des zweiten Allels (Abbildung **16 A**), was den genauen Ergebnissen des *Indel*-Diagramms der ICE-Analyse aus Abbildung **15 C** entsprach. Da die Deletionen wahrscheinlich an einem *Branchpoint* für das Splicing liegen, kann es hier zu Splicing-Defekten kommen, die dann wiederum zu Leserasterverschiebungen in der mRNA-Sequenz führen (Will und Lührmann 2011). Durch ein so entstandenes vorzeitiges Stopp-Codon wird die mRNA durch *nonsense-mediated mRNA decay* abgebaut (Kurosaki und Maquat 2016). Die vorliegende Nutlin-3a-Resistenz bestätigt das Vorliegen eines *p53-Knockouts*.

Zusammengefasst wurde so die erfolgreiche Generierung von Einzelzellklonen durchgeführt, die auf einem Allel die LSL-Kassette tragen und auf den anderen beiden Allelen durch Deletionen kein *p53* exprimieren (Im Folgenden werden diese Zellen bezeichnet als: H460^{Δ/Δ/LSL}) (Abbildung **16 B**).

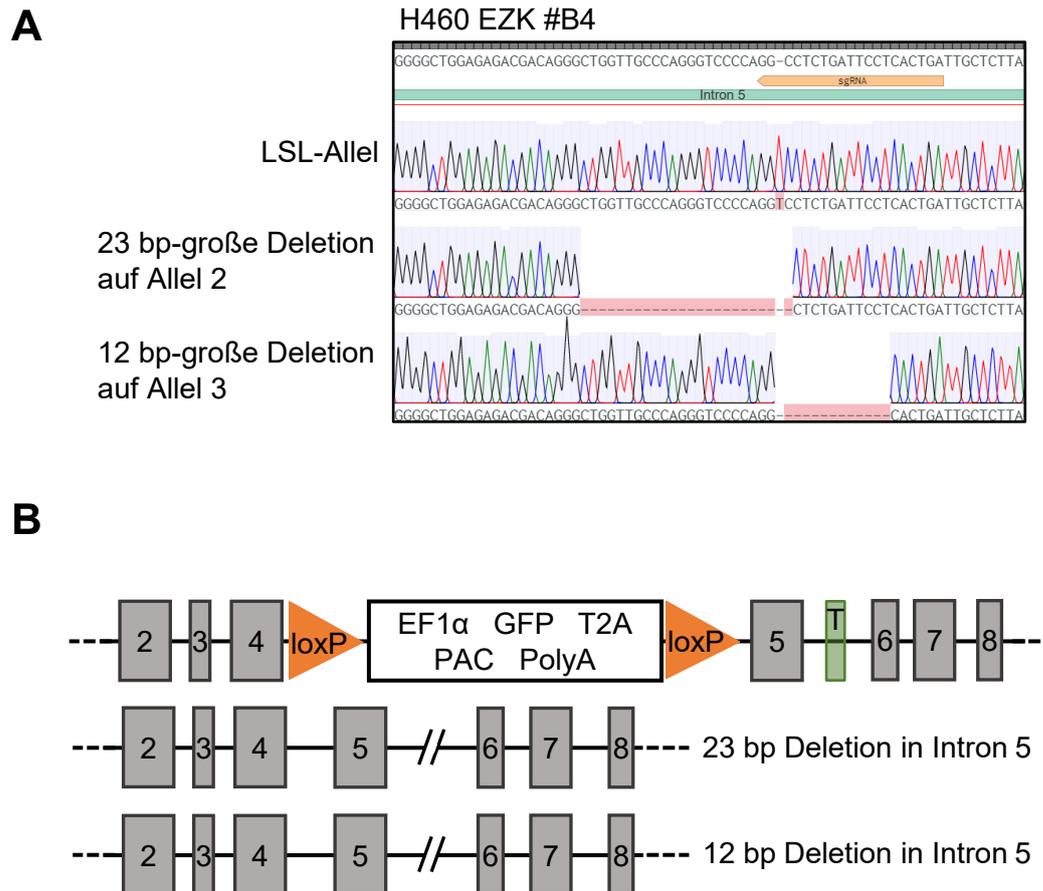


Abbildung 16: Darstellung der generierten Deletionen der beiden *TP53*-Knockout-Allele durch TOPO-Klonierung.

A: Durchführung einer PCR, die den Bereich von Intron 4-6 von *TP53* zweier EZKs amplifizierte, wodurch alle drei Allele abgebildet wurden (Daten nicht gezeigt). Die Amplikons wurden anschließend in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor (ThermoFisher Scientific) kloniert und es wurden Mini-Präparationen aus Kulturen einzelner Kolonien durchgeführt. Diese wurden dann per Sanger-Sequenzierung charakterisiert. Repräsentative Darstellung der drei unterschiedlichen Resultate aus 11 analysierten Mini-Präparationen. 3 Präparationen trugen das LSL-Allel, 2 Präparationen das Allel mit der 23 bp Deletion und 5 Präparationen das Allel mit der 12 bp Deletion.

B: Schematische Darstellung aller drei Allele der so generierten Zelllinie H460^{Δ/Δ/LSL}.

4.1.4. H460^{Δ/Δ/LSL}-Zellen zeigen eine Induzierbarkeit der Wtp53-Expression nach AdenoCre-Infektion

Bevor erste spezifische Editierungen zum Beispiel im Rahmen einer Mutagenese vorgenommen wurden, sollte zunächst grundsätzlich gezeigt werden, dass die Cre-Rekombination durch adenovirale Infektion bei dieser Zelllinie funktioniert. Dies sollte durch den Nachweis einer p53-Expression nach Adenovirus-Infektion durch einen Western Blot validiert werden. Zunächst wurden die 6 infrage kommenden Einzelzellklone mit einem Adenovirus infiziert, der aktiv exprimierende Cre-Recombinase in die Zelle transduziert („AdenoCre“) (Abbildung 17 A). Die Menge an Virus orientiert sich hier an dem mathematischen Verhältnis von Viruspartikeln zu Zellen, auch Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*, MOI) genannt. H460-Zellen benötigten in vergangenen Experimenten recht hohe Viruslast, um effiziente Infektion zu zeigen. Deshalb wurde in diesem Experiment ein MOI von 250 gewählt, sodass rechnerisch 250 Viruspartikel auf eine Zelle kommen. Die Rekombination wurde nach 7 Tagen (Daten nicht gezeigt) und nach 14 Tagen durch eine FACS-Analyse kontrolliert (Abbildung 17 B). Hierbei zeigte sich nach 14 Tagen ein Anteil von 50-74 % an GFP-negativen Zellen. Die Zellen, die GFP-negativ waren, tragen keine LSL-Kassette mehr und sollten somit wieder p53 exprimieren. Diese Hypothese wurde durch einen Western Blot bestätigt (Abbildung 18). Wie erwartet zeigen die Zellen vor der AdenoCre-Infektion auch unter Nutlin-3a-Behandlung keine p53-Expression. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen nach AdenoCre-Infektion den Erwartungen entsprechend eine deutliche Induzierbarkeit von p53-Expression unter Nutlin-3a-Behandlung. Darüber hinaus wurde in den AdenoCre-infizierten Zellen auch die Expression von den zwei wichtigen Zielproteinen p21 und Mdm2 untersucht. Beide sollten hier induziert werden, da nach Cre-Rekombination Wildtyp-p53 exprimiert wurde. p21 als Hauptmediator des p53-vermittelten Zellzyklusarrest (El-Deiry 1993) und Mdm2 durch einen autoregulatorischen Feedback-Loop (Haupt et al. 1997) werden beide durch stabilisiertes Wildtyp-p53 direkt aktiviert. Wie erwartet wurden sie auch in den mit Nutlin-3a-behandelten AdenoCre-infizierten Zellen verstärkt nachgewiesen. All das gibt hinreichenden Hinweis darauf, dass die Rekombination der LSL-Kassette durch AdenoCre-Infektion mit anschließender erneuter Initiierung der Wildtyp-p53-Expression des ehemaligen LSL-Allels erfolgreich war.

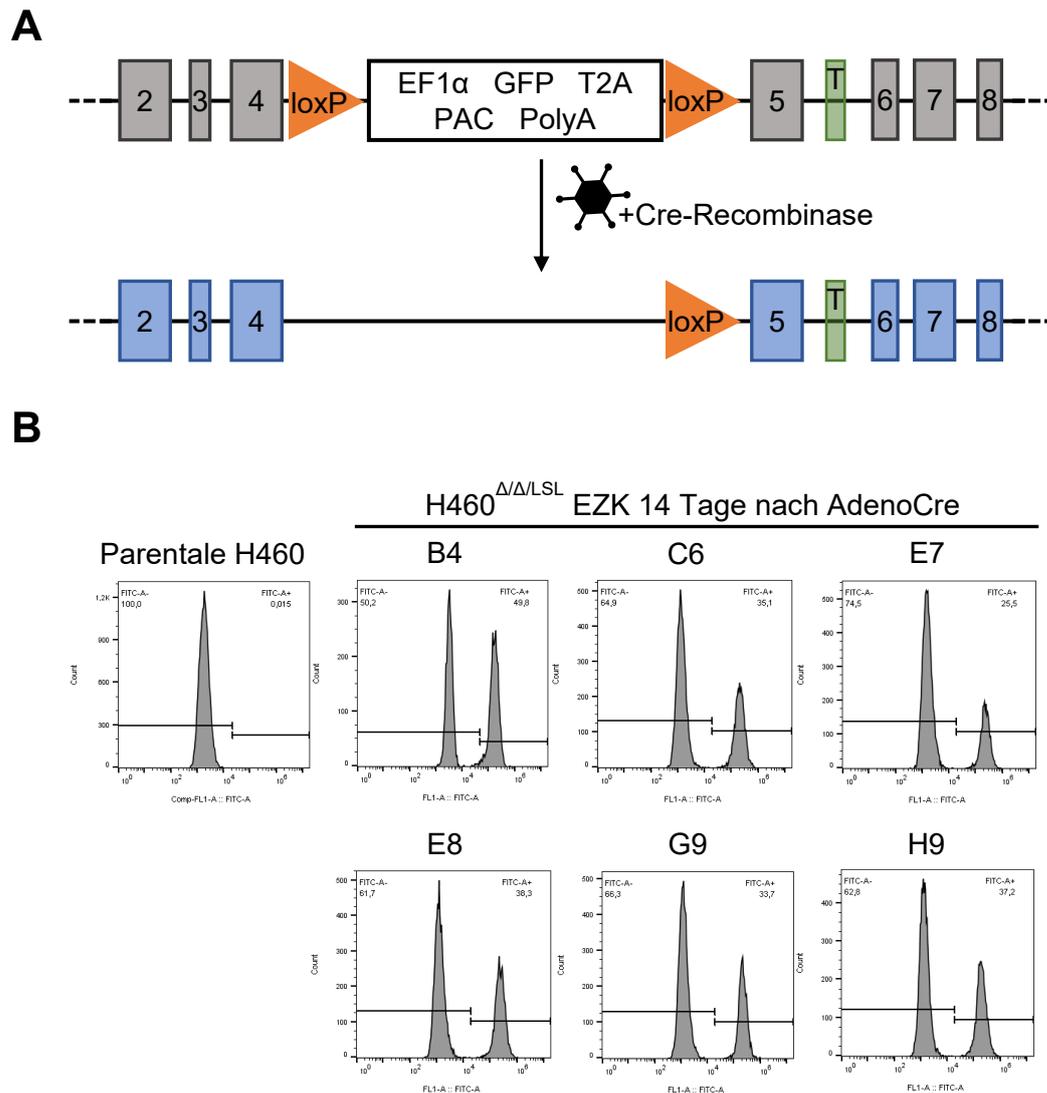


Abbildung 17: Rekombination der H460^{ΔΔ/LSL}-Zellen nach AdenoCre-Infektion wurde via FACS dargestellt.

A: Schematische Darstellung des Ablaufs der Cre-Rekombination nach adenoviraler Infektion. Nach Rekombination der LSL-Kassette wird aus einem inaktiven Allel (grau) ein aktives exprimierendes Allel (blau).

B: Durchflusszytometrie 14 Tage nach Infektion mit dem Adenovirus + Cre-Recombinase MOI250. Filterung durch den FITC-Kanal. FITC-Positivität korreliert mit Expression von GFP.

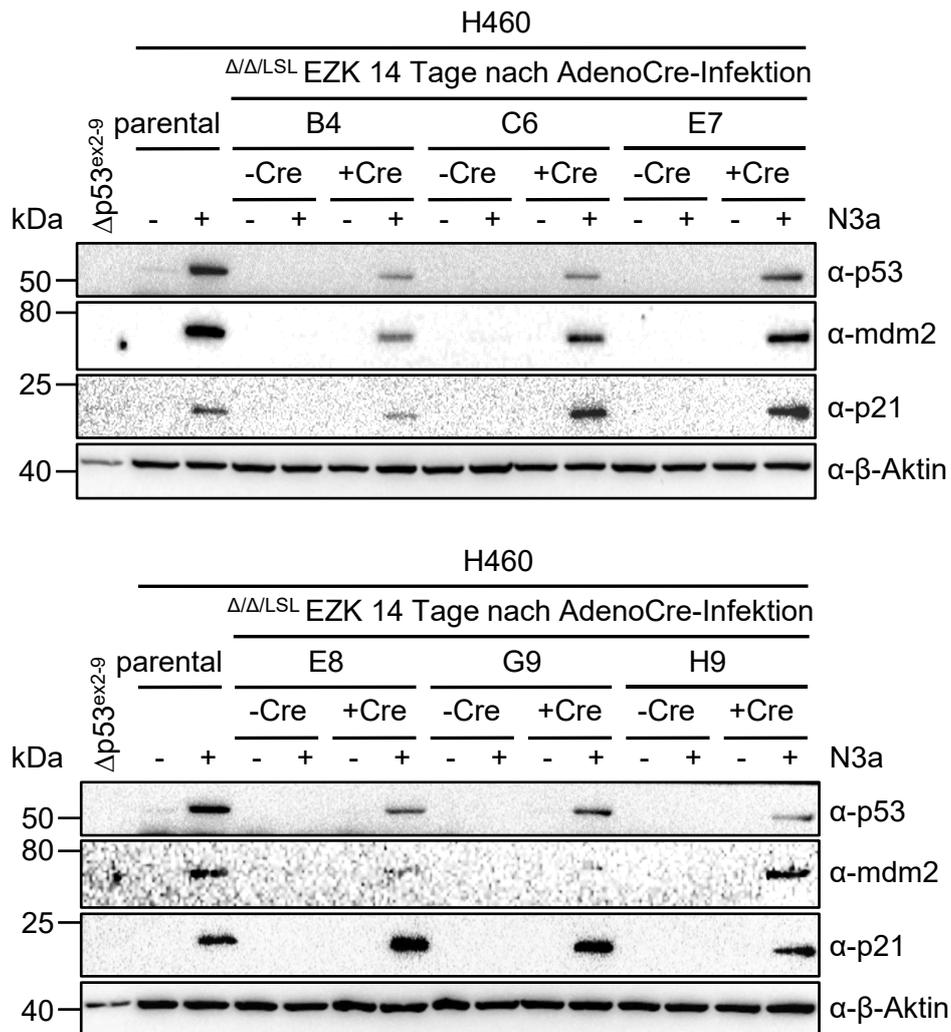


Abbildung 18: Im Western Blot zeigten H460 ^{$\Delta\Delta/LSL$} -Zellen eine Induzierbarkeit der p53-Expression nach AdenoCre-Infektion.

Western Blot 14 Tage nach AdenoCre-Infektion (+Cre) verglichen mit Zellen vor AdenoCre-Infektion (-Cre). Beide wurden jeweils für 24 h mit 10 μ M Nutlin-3a (+N3a) oder DMSO (-N3a) behandelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen mit p53-Deletion von Exon 2 – 9; zur Positivkontrolle dienten WT-H460-Zellen.

4.1.5. Die erfolgreiche Generierung Puromycin-sensitiver H460^{Δ/Δ/LSL}-Einzelzellklone legt den Grundstein für spätere Mutagenese

Als nächster Schritt wurden aus Zellen vor Cre-Rekombination (4.1.3) Puromycin-sensitive Einzelzellklone unter Erhalt der LSL-Kassette generiert. Dieser Schritt war essenziell, um in nachfolgenden *TP53*-Mutagenese-Experimenten erneut mit Puromycin selektionieren zu können. Wie in 4.1.2 beobachtet werden konnte, war außerdem der initiale Einbau einer kompletten LSL-Kassette recht ineffizient, was wahrscheinlich unter anderem an ihrer Größe von 2,7 Kilobasen (kb) liegt (Mali et al. 2013; Wang et al. 2013). Somit wäre ein direkter Einbau von Mutationen in parentale Zellen viel zu ineffizient und fehleranfällig gewesen.

Um nun Puromycin-sensitive Zellen zu generieren, wurden sie zunächst mit Cas9 und einer sgRNA gegen das Puromycin-Gen (pX459_Hygro_sgPuro.3) transfiziert, was durch den induzierten Doppelstrangbruch und dem dadurch induzierten NHEJ zu *Indels* im *pac*-Gen führen sollte (Abbildung 19 A). Nach mehrmaliger Testung wurden so zwei Puromycin-sensitive Einzelzellklone generiert, die für weitere Experimente verwendet wurden (#B4.1, #E7.6). Anschließend wurde durch eine FACS-Analyse kontrolliert, ob die Zellen noch grün fluoreszieren, um einen spontanen Verlust der LSL-Kassette auszuschließen (Abbildung 19 B). Hier zeigen die beiden Klone erwartungsgemäß eine uniforme GFP-Positivität von 99,7 % der Zellen.

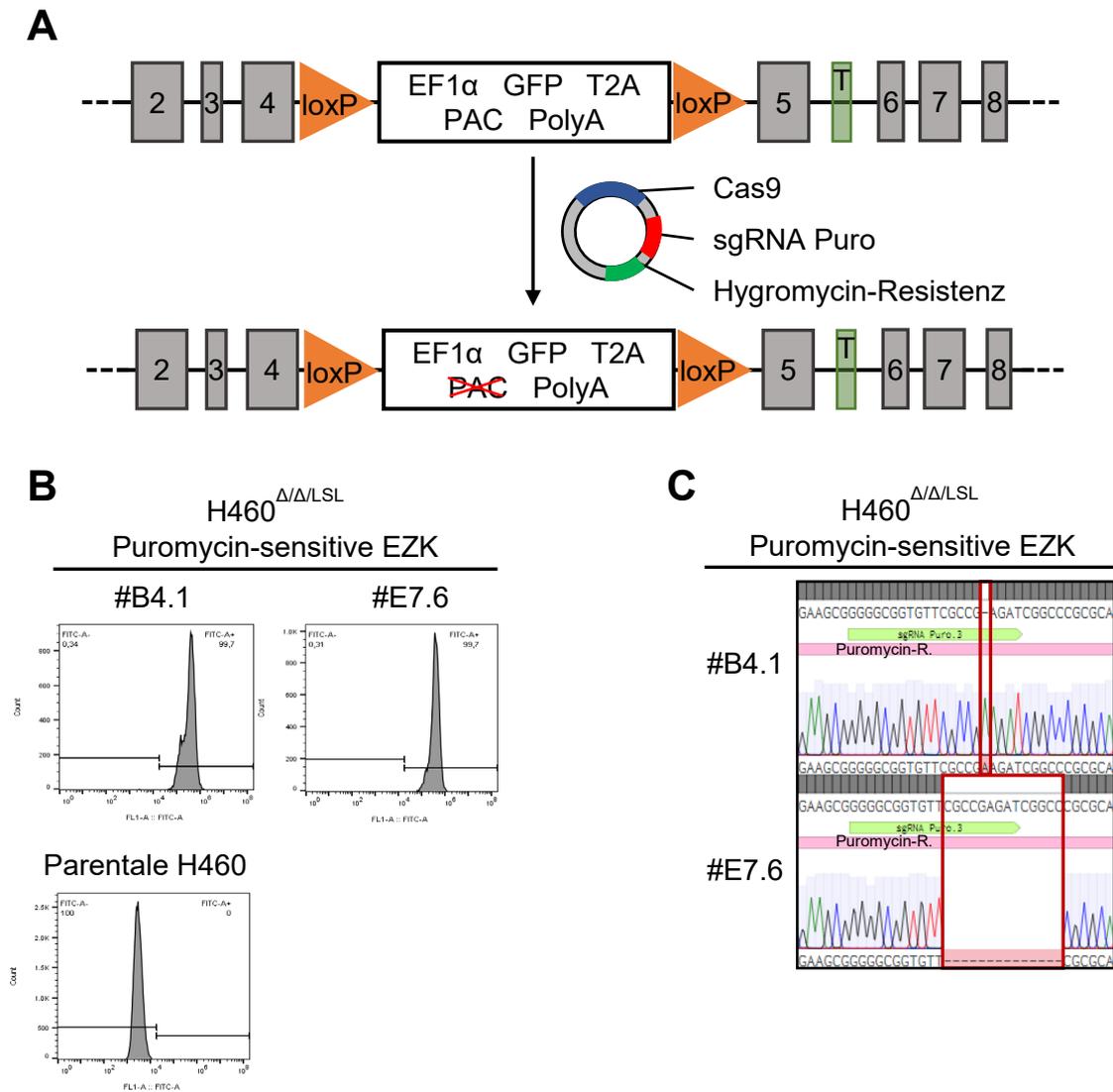


Abbildung 19: Validierung der erfolgreichen Generierung Puromycin-sensitiver H460^{Δ/Δ/LSL}-Zellklone durch Sanger-Sequenzierung und FACS.

A: Schematische Darstellung des *Knockouts* des Puromycin-Gens auf dem LSL-Allel.

B: Durchflusszytometrie der beiden generierten Einzelzellklone (EZK), die nach Transfektion aus **A** Puromycin-sensitiv geworden sind. Filterung durch den FITC-Kanal. FITC-Positivität korreliert mit Expression von GFP.

C: Sanger-Sequenzierung des Puromycin-Gens beider Puromycin-sensitiver (PuroS) EZKs.

Des Weiteren wurden von beiden dieser Klone die induzierten Veränderungen von *pac* per Sanger-Sequenzierung charakterisiert (Abbildung 19 C). Hier wurde eine Deletion von 14 bp Länge bzw. eine Insertion von 1 bp Länge observiert. Per Kolonieformationstest wurde bei beiden dieser Klone die Puromycin-Sensitivität bei gleichzeitiger Nutlin-3a-Resistenz objektiv bestätigt (Abbildung 20). Als Kontrolle wurden hier nochmals die Zellen vor der Transfektion mit der sgRNA gegen *pac* untersucht, die wie erwartet sowohl gegen Puromycin als auch gegen Nutlin-3a resistent sind. Zusätzlich zeigen parentale H460-Zellen wie erwartet eine Puromycin- und Nutlin-3a-Sensitivität. Somit wurden erfolgreich Puromycin-sensitive $H460^{\Delta/\Delta/LSL}$ -Einzelzellklone generiert, mit denen nun im Folgenden weitergearbeitet werden kann.

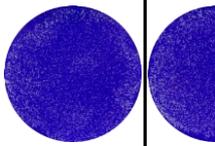
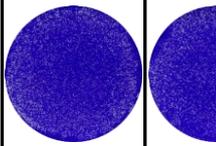
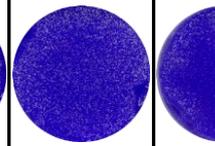
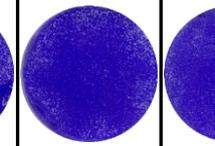
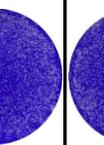
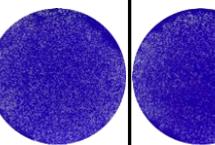
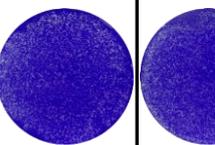
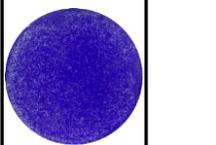
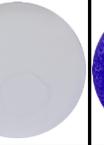
	Parentale H460	$H460^{\Delta/\Delta/LSL}$ EZK			
		#B4 PuroR	#B4.1 PuroS	#E7 PuroR	#E7.6 PuroS
+DMSO					
+N3a 10 μ M					
+ Puromycin 1 μ g/ml					

Abbildung 20: Kolonieformationstest beider Puromycin-sensitiver Einzelzellklone.

Die Behandlung erfolgte für 8 Tage mit den entsprechenden Substanzen DMSO, 10 μ M Nutlin-3a (N3a) oder 1 μ g/ml Puromycin.

4.2. Die erfolgreiche Mutagenese des R175-Lokus in den etablierten H460 Δ/Δ /LSL-Zellen durch CRISPR/Cas9 und HDR

4.2.1. Einbau von Mutationen durch CRISPR/Cas9 und HDR resultiert in H460 Δ/Δ Zellen mit mut-p53-Expression

4.2.1.1. Nach Transfektion der R175-mutierten Vektoren wird ein effizienter Einbau von diesen auf DNA-Ebene gezeigt

In die in 4.1.5 generierten Einzelzellklone kann nun erneut durch CRISPR/Cas9-vermittelte Doppelstrangbrüche und homologe Rekombination eine neue Sequenz eingebaut werden, die eine LSL-Kassette mit funktionierendem *pac* trägt und zusätzlich auf einem der Homologie-Arme eine Punktmutation trägt. Nach anschließender Cre-Rekombination durch adenovirale Infektion würden so Zellen entstehen, die mutiertes p53 unter physiologischen Bedingungen exprimieren (Abbildung 21).

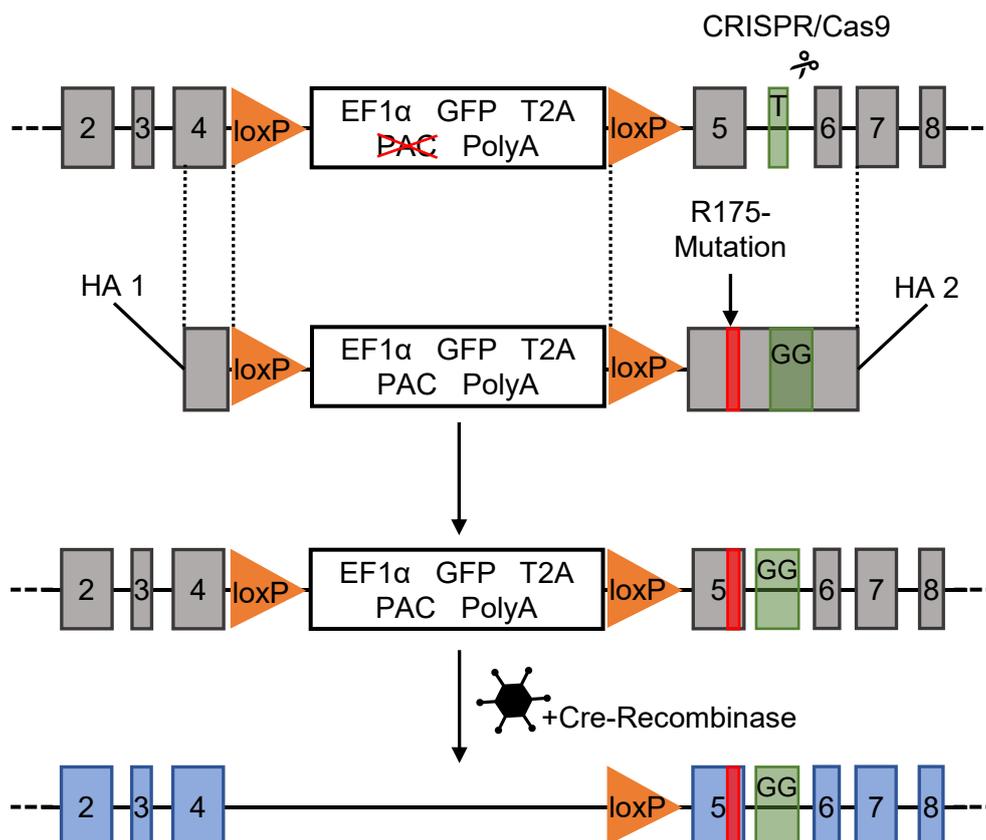


Abbildung 21: Schema der R175-Mutagenese durch CRISPR/Cas9-vermittelte HDR.

“T” = eingefügte Thymin-Base in Intron 5. “GG” = mutierte DNA-Sequenz im Bereich der PAM zu zwei Guanin-Basen.

Bevor durch dieses Prinzip in größerem Maßstab Mutationen eingebaut werden können, sollte es erst in kleinerem Umfang getestet werden. Dafür wurden zunächst 3 einzelne

Mutationen an der Position R175 eingebaut: Die am häufigsten in menschlichen Tumoren zu findende p53-Mutation R175H (Kandoth et al. 2013; TCGA Research Network), die zu vollständigem Funktionsverlust (*loss-of-function*, *LOF*), bzw. sogar darüber hinaus zum Erlangen zusätzlicher Funktionen (*gain-of-function*, *GOF*) führt (Muller und Vousden 2014). Zweitens die Mutation R175P, die zu einem partiellen Funktionsverlust (*partial LOF*, *pLOF*) führt und dadurch zwar p21-Expression aktivieren kann, jedoch keine Apoptose-Induktion mehr möglich ist (Ludwig et al. 1996). Als drittes erfolgte noch der Einbau eines Stopp-Codons, R175STOP, das durch einen vorzeitigen Kettenabbruch zum Verlust der p53-Expression führen soll. Die Vektoren mit intakter LSL-Kassette sowie der entsprechenden Punktmutation an Position R175 des Homologie-Arms 2 wurden in die Zellen transfiziert. Die verwendete sgRNA (sgRNA px459-sgRNA_in5_p53+T) zielt auf die gleiche Sequenz in Intron 5 wie in 4.1.1, hat jedoch die dort inserierte Thymin-Base bereits in ihrer Sequenz eingebaut.

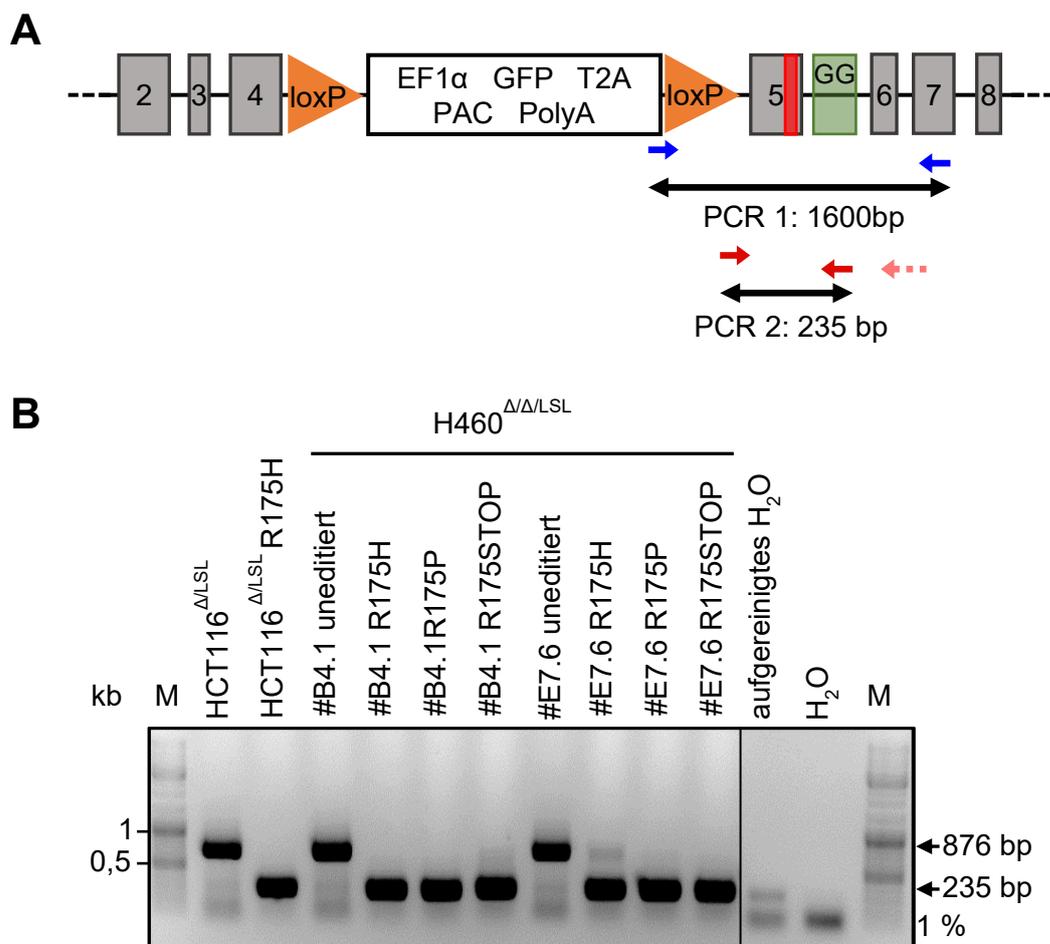


Abbildung 22: Darstellung des LSL-Allels nach Transfektion durch geschachtelte PCR.

A: Schematische Darstellung der entworfenen verschachtelten PCR zur Darstellung der Mutationen. Gestrichelter Pfeil entspricht 15 bp-langen 3'-Konsensus Sequenz.

B: Auftrennung der Amplikons nach der PCR aus A durch 1 %ige Agarose-Gelelektrophorese.

Um zu verhindern, dass die sgRNA nach erfolgreichem Einbau des Mutations-tragenden Vektors erneut binden kann, tragen diese verwendeten Vektoren nicht mehr die Thymin-Base in Intron 5. Stattdessen wurde das 3'-Ende der sgRNA mutiert, von 5'-GG-3' zu 5'-CC-3' (Dies entspricht der dargestellten 5'-GG-3'-Sequenz des codogenen Strangs, vgl. Abbildung 22 A). Durch die drei entstandenen Nichtübereinstimmungen zwischen Vektor und sgRNA sollte die Effizienz der Editierung erhöht werden. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert, sodass nur Zellen, die erfolgreich den neuen Vektor mit der R175-Mutation eingebaut hatten, überlebten. Die GFP-Positivität nach der Transfektion wurde erneut per FACS-Analyse validiert (Suppl. Abbildung I). Nun wurde der erfolgreiche Einbau der R175-Mutation direkt auf DNA-Ebene mittels einer geschachtelten PCR nachgewiesen. Hierbei wurde in einer LSL-allelspezifischen PCR Exon 5 von *TP53* abgebildet (Abbildung 22 A). Hierbei wurde der rückwärts-Primer in Intron 5 so entworfen, dass seine Sequenz die mutierte CC-Sequenz im Bereich der Sequenz, an die die PAM bindet, trägt, jedoch nicht das inserierte T. Dadurch wurden nur mutationstragende Allele amplifiziert. Uneditierte Zellen, die zwar die LSL-Kassette trugen, jedoch nicht die Mutation, haben noch das inserierte T und die GG-Sequenz im Bereich der PAM, wodurch der rückwärts-Primer an dieser Stelle nicht binden konnte. Stattdessen bindet dieser rückwärts-Primer eine Sequenz in Intron 6, wo eine 15 bp 3'-Konsensus-Sequenz dieses Primers ist. Dadurch entstand ein deutlich größeres Fragment von 876 bp (Abbildung 22 B). In der anschließenden Sanger-Sequenzierung zeigte sich ein sehr sauberer Einbau der Mutante (Abbildung 23).

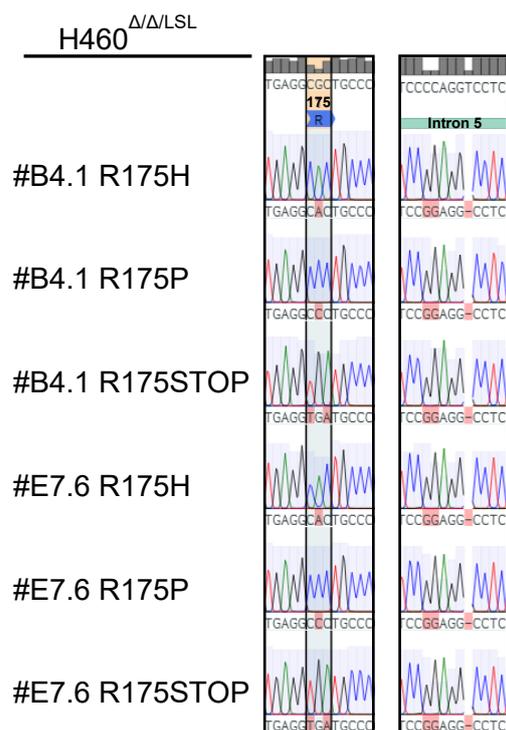


Abbildung 23: Sanger Sequenzierung zeigte effizienten Einbau der R175-Vektoren auf DNA-Ebene.

Sanger-Sequenzierung der Amplikons aus der PCR nach Abbildung 22 A. Darstellung der Region in Exon 5, R175, sowie der Region in Intron 5 im Bereich der GG-Sequenz. Uneditierte Zellen hätten hier statt der GG-Sequenz ein inseriertes T 4 Basen *downstream* gezeigt.

4.2.1.2. Nach AdenoCre-vermittelter Rekombination der LSL-Kassette zeigt sich die aktive Expression der entsprechenden p53 R175-Mutante

Nach dem gleichen Prinzip wie in 4.1.4 sollte nun erneut die LSL-Kassette durch AdenoCre-Infektion rekombiniert werden. Dadurch entstehen in diesem Fall Zellen, die aktiv die entsprechende Mutante auf physiologischem Expressionslevel exprimieren. Zunächst wurden die Zellen erneut mit einer MOI von 250 infiziert. Nach 10 Tagen wurde eine FACS-Analyse zur Beurteilung der Rekombinations-Effizienz durchgeführt. Hier zeigte sich eine sehr gute GFP-Negativität von 84-94 % (Abbildung 24), was bedeutet, dass dieser entsprechende Anteil an Zellen erfolgreich rekombiniert wurde und keine LSL-Kassette mehr trägt.

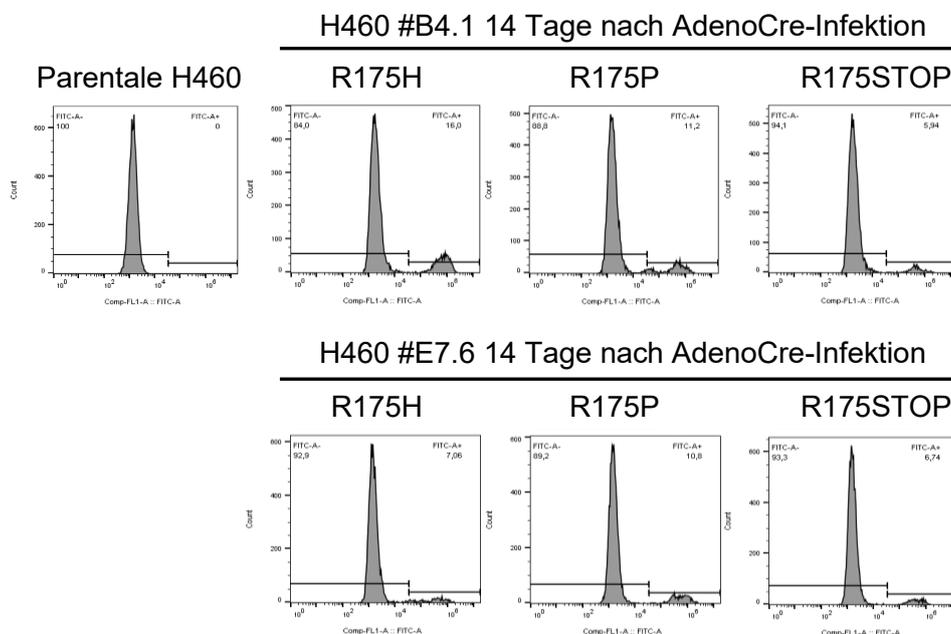


Abbildung 24: Durchflusszytometrie der R175-Mutanten 14 Tage nach AdenoCre-Infektion zeigte gewünschte GFP-Negativität nach Rekombination.

Filterung durch den FITC-Kanal. FITC-Positivität korreliert mit Expression von GFP.

Um nun gewährleisten zu können, dass bei weiteren Experimenten wirklich alle untersuchten Zellen die entsprechende Mutation exprimieren, wurden Einzelzellklone generiert. Die Expression der R175-Mutation des Einzelzellklons wurde für R175H und R175P durch cDNA-Sequenzierung nachgewiesen (Suppl. Abbildung II). Von R175STOP war die Auswertung der cDNA leider nicht möglich, was durch *nonsense-mediated mRNA-Decay* der entstandenen *nonsense*-mRNA erklärt werden kann (Kurosaki und Maquat 2016).

Nachdem die tatsächliche Expression der Mutanten validiert worden war, wurde zusätzlich nochmals die Expression von p53 und seiner Zielproteine p21 und Mdm2 observiert. Dafür wurden die Zellen sowohl nach als auch vor AdenoCre-Infektion mit Nutlin-3a behandelt und per Western Blot dargestellt (Abbildung 25). Es zeigte sich eine sehr gute p53-Expression aller Einzelzellklone. Wie erwartet zeigten sich bei den R175H und R175STOP-Einzelzellklonen keine p21 oder Mdm2-Induktion durch p53. Bei dem R175P-Klon der Ursprungszelle #B4.1 ließ sich jedoch eine leichte Aktivierung von p21 und Mdm2 beobachten, was auf den nur partiellen Funktionsverlust dieser Mutante zurückzuführen ist und somit der Erwartung entspricht (Ludwig et al. 1996). Auffällig war auch der R175P-Einzelzellklon des Ursprungklons #E7.6, der eine deutlich niedrigere Bande als erwartet zeigte, weshalb ab diesem Zeitpunkt der Einzelzellklon #E7.6 nicht mehr für weitere Experimente verwendet wurde.

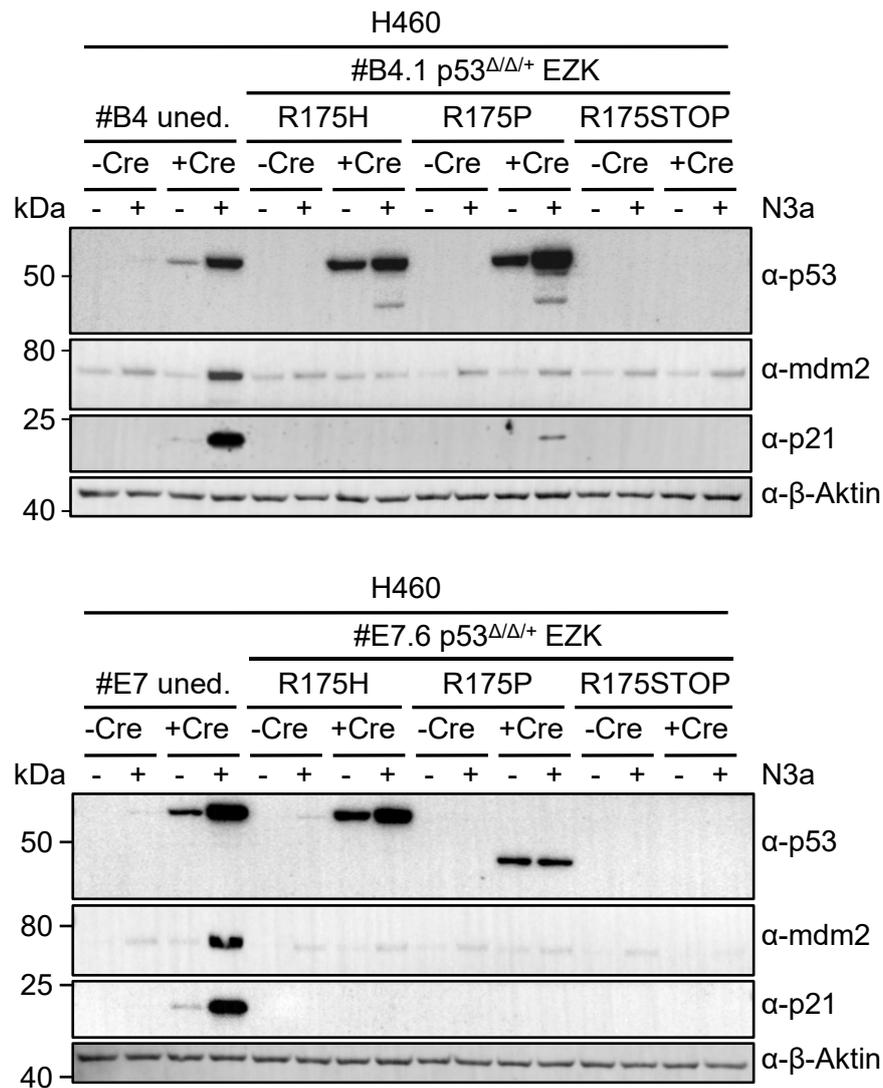


Abbildung 25: Nach AdenoCre-Infektion zeigte sich aktive Expression der entsprechenden p53-R175-Mutante vom endogenen Lokus.

A: Western Blot von Einzelzellklonen, die die jeweilige Mutation exprimierten. Die Einzelzellklone nach AdenoCre-Infektion (+Cre) wurden verglichen mit deren polyklonalen Zellpools von vor AdenoCre-Infektion (-Cre). Beide wurden jeweils für 24 h mit 10 μ M Nutlin-3a (+N3a) oder DMSO (-N3a) behandelt. Uned.= Klone vor Transfektion der R175-Mutante.

Nun wurde eine quantitative PCR durchgeführt, bei der die relative Expression von *CDKN1A* (p21) vor und nach AdenoCre-Infektion, mit und ohne Nutlin-3a-Behandlung untersucht wurde (Abbildung 26). Als Kontrolle diente der Ursprungs-Einzelzellklon #B4, der noch die Wildtyp-Exon 5-Sequenz trug. Nach AdenoCre-Infektion und unter Nutlin-3a-Behandlung zeigten diese wie erwartet eine deutliche *CDKN1A*-Induktion um das 60- bis 120-fache. Im Gegensatz dazu zeigten die Einzelzellklone der R175H- und R175STOP-Mutanten wie erwartet keine Induktion unter Nutlin-3a, da sie als *loss-of-function*-Mutanten keine Zielproteine wie p21 mehr induzieren können. Der R175P-Einzelzellklon zeigte jedoch eine leichte *CDKN1A*-Aktivierung durch Nutlin-3a nach AdenoCre-Infektion, die mit dem Ergebnis des Western Blots korrelierte und wie erwähnt auf den partiellen Funktionsverlust dieser Mutation zurückzuführen ist. Auf die Betrachtung der *TP53*-Expression wurde hier verzichtet, da p53 erst auf Proteinebene unter anderem durch Polyubiquitinierung von Mdm2 reguliert wird und noch nicht auf mRNA-Ebene, die in der qPCR betrachtet werden würde (Kruse und Gu 2009). Dadurch kann durch eine qPCR kein Rückschluss auf die p53-Regulation bzw. die p53-Akkumulation in den Zellen geschlossen werden.

Zusammengefasst konnte in dieser Experimentreihe gezeigt werden, dass der Einbau von einzelnen Mutanten mit anschließender aktiver Expression dieser Mutanten vom endogenen Locus gut funktioniert. Somit konnte im Folgenden die Mutagenese in etwas größerem Umfang begonnen werden. Exemplarisch wurde als Nächstes eine saturierte Mutagenese des R175-Codons durchgeführt.

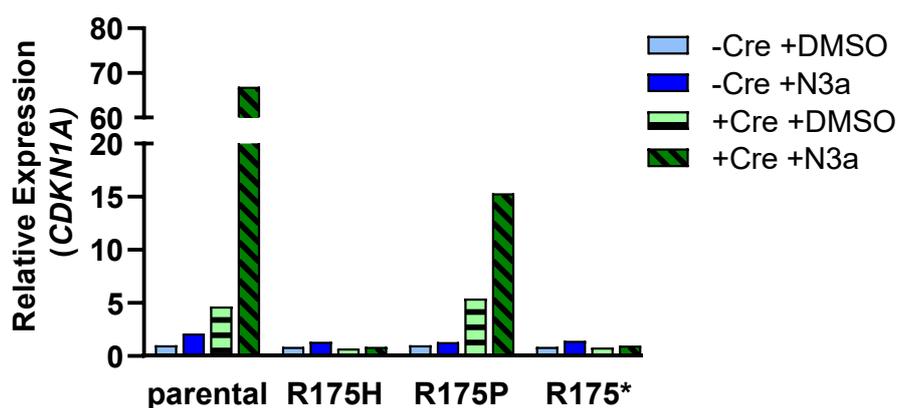


Abbildung 26: Quantitative PCR von *CDKN1A* in #B4.1 R175-Mutanten.

Bestimmung der Relativen Expression von *CDKN1A* durch quantitative PCR der cDNA von den Einzelzellklonen, die die Mutation in der Sanger-Sequenzierung zeigen. Die Einzelzellklone nach AdenoCre-Infektion (+Cre) wurden verglichen mit deren polyklonalen Zellpools vor AdenoCre-Infektion (-Cre). Beide wurden jeweils für 24 h mit je 10 μ M Nutlin-3a (+N3a) oder DMSO behandelt.

4.2.2. Die saturierte Mutagenese des R175-Codons der H460^{ΔΔ/LSL} #B4.1-Zellen zeigt die Verwendungsmöglichkeit dieser Zellklone für Hochdurchsatzmutagenese

Nun wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Einzelzellklon H460^{ΔΔ/LSL} #B4.1 *PuroS* eine erste saturierte Mutagenese des R175-Codons durchgeführt (R175-Library) (Abbildung 27). Das Ziel war hierbei, die An- oder Abreicherung verschiedener Mutanten unter Nutlin-3a-Behandlung zu observieren. Die transfizierte Vektormischung besteht hierbei aus 28 einzelnen HDR *template*-DNAs, die alle eine andere Mutation tragen. Im Detail bestehen sie aus 20 nicht-synonymen Mutationen durch Aminosäureaustausch, einer *nonsense*-Mutation, einer Deletion des Codons R175, drei synonymen Mutationen und drei Mutationen, die zu einer Verschiebung des Leserasters führen (*frameshift*-Mutation). Diese Vektormischung wurde zusammen mit der zuvor verwendeten sgRNA in drei unabhängigen biologischen Replikaten transfiziert.

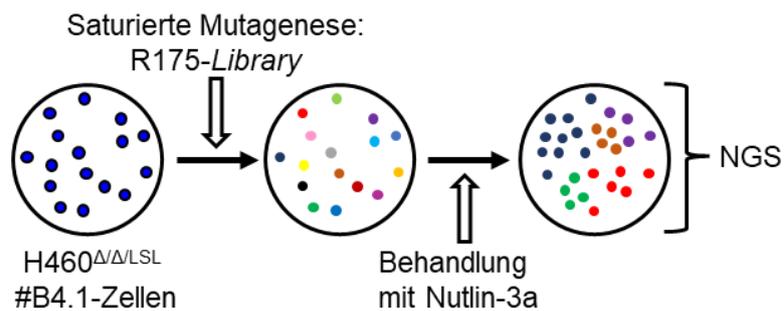


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Saturierte-Mutagenese-Experiments.

Unterschiedliche Farben stellen unterschiedliche Genotypen bzw. Mutationen dar. Der H460^{ΔΔ/LSL}-Einzelzellklon wurde mit der sgRNA und der R175-Library transfiziert. Nach Nutlin-3a-Behandlung für 10 Tage wurde durch Next Generation Sequencing (NGS) gemessen, welche Mutanten sich an- oder abgereichert haben.

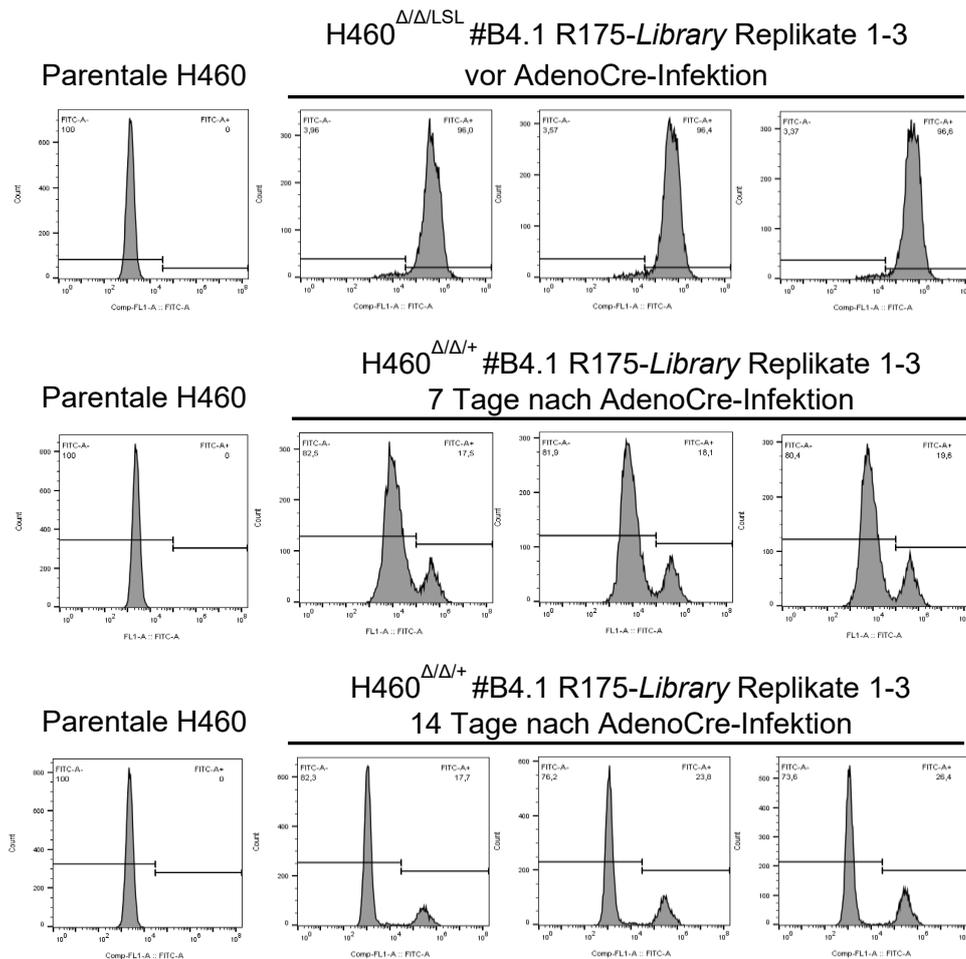


Abbildung 28: Durchflusszytometrie für GFP der R175-Library vor AdenoCre-Infektion und 7 bzw. 14 Tage nach AdenoCre-Infektion.

Nach 7-tägiger Puromycin-Selektion wurde die GFP-Positivität durch eine FACS-Analyse validiert, um dies später mit den Zellen nach AdenoCre-Infektion vergleichen zu können (Abbildung 28, oben).

Nun wurde die LSL-Kassette der Zellen wieder durch eine AdenoCre-Infektion mit MOI 250 herausgeschnitten. Der Erfolg dieser Rekombination wurde nach 7 Tagen (Abbildung 28, Mitte) und nach 14 Tagen durch FACS-Analyse kontrolliert (Abbildung 28, unten). Nach 14 Tage zeigten sich 73-86 % der Zellen GFP-negativ. Die nicht rekombinierten Zellen waren hier nicht weiter problematisch, da sie in der späteren PCR nicht mehr amplifiziert wurden und somit auch nicht das Endergebnis verfälschen konnten.

Anschließend erfolgte eine 10-tägige Behandlung mit Nutlin-3a, mit dem Hintergrund, dass sich durch diese lange Nutlin-3a-Behandlung Mutanten, die mit p53-Funktionsverlust einhergehen, anreichern sollten, wohingegen Mutanten, die keinen großen Einfluss auf die Funktion von p53 haben, depletiert sein sollten. Dies hat den Hintergrund, dass p53 bei annähernd erhaltener Funktion und Konformation durch Nutlin-3a und die dadurch induzierte Mdm2-Inhibition stabilisiert wird und bei den Zellen Zellyklus-Arrest oder Apoptose einleiten kann (Freed-Pastor und Prives 2012; Vassilev et al. 2004). Nun wurde spezifisch die DNA der editierten und rekombinierten Zellen isoliert und durch geschachtelte PCR amplifiziert (Abbildung 29 A). Zunächst wurden in PCR 1B durch den vorwärts Primer in Intron 4 und dem rückwärts Primer in Exon 7 bei kurzer Elongationszeit nur jene Allele ohne LSL-Kassette amplifiziert. Dies beinhaltet sowohl die rekombinierten mutierten Allele als auch die beiden deletionstragenden Allele. Die Proben vor AdenoCre-Infektion wurden durch die LSL-allelspezifische PCR 1A amplifiziert, wodurch zunächst auch jene LSL-Allele ohne R175-Editierung dargestellt wurden. Im nächsten Schritt wurde mit PCR 2 das R175-Codon von Exon 5 dargestellt. Dabei hat der rückwärts Primer eine komplementäre Sequenz für Allele, die eine mutierte GG-Sequenz im Bereich der PAM-Sequenz der sgRNA haben, jedoch kein inseriertes T in Intron 5 trägt. Somit wurden nur R175-editierte Allele vor und nach AdenoCre-Infektion amplifiziert, nicht jedoch die deletionstragenden Allele nach PCR 1B bzw. die uneditierten LSL-Allele aus PCR 1A. Sowohl der vorwärts- als auch der rückwärts-Primer besitzen am 5'-Ende einen je 13 bp langen Barcode, um die Amplikons später beim *Next Generation Sequencing* (NGS) den jeweiligen Proben zuordnen zu können. Somit entstanden nach PCR-Amplifikation 261 bp-lange Amplikons, die sich in der Agarose-Gelelektrophorese in allen Proben wie erwartet zeigte (Abbildung 29 B). Wider Erwarten wurde eine Bande bei den parentalen H460-Zellen observiert. Dies war unproblematisch, da amplifizierte Wildtyp-Amplikons bei der NGS erkannt und von der Analyse ausgeschlossen wurden.

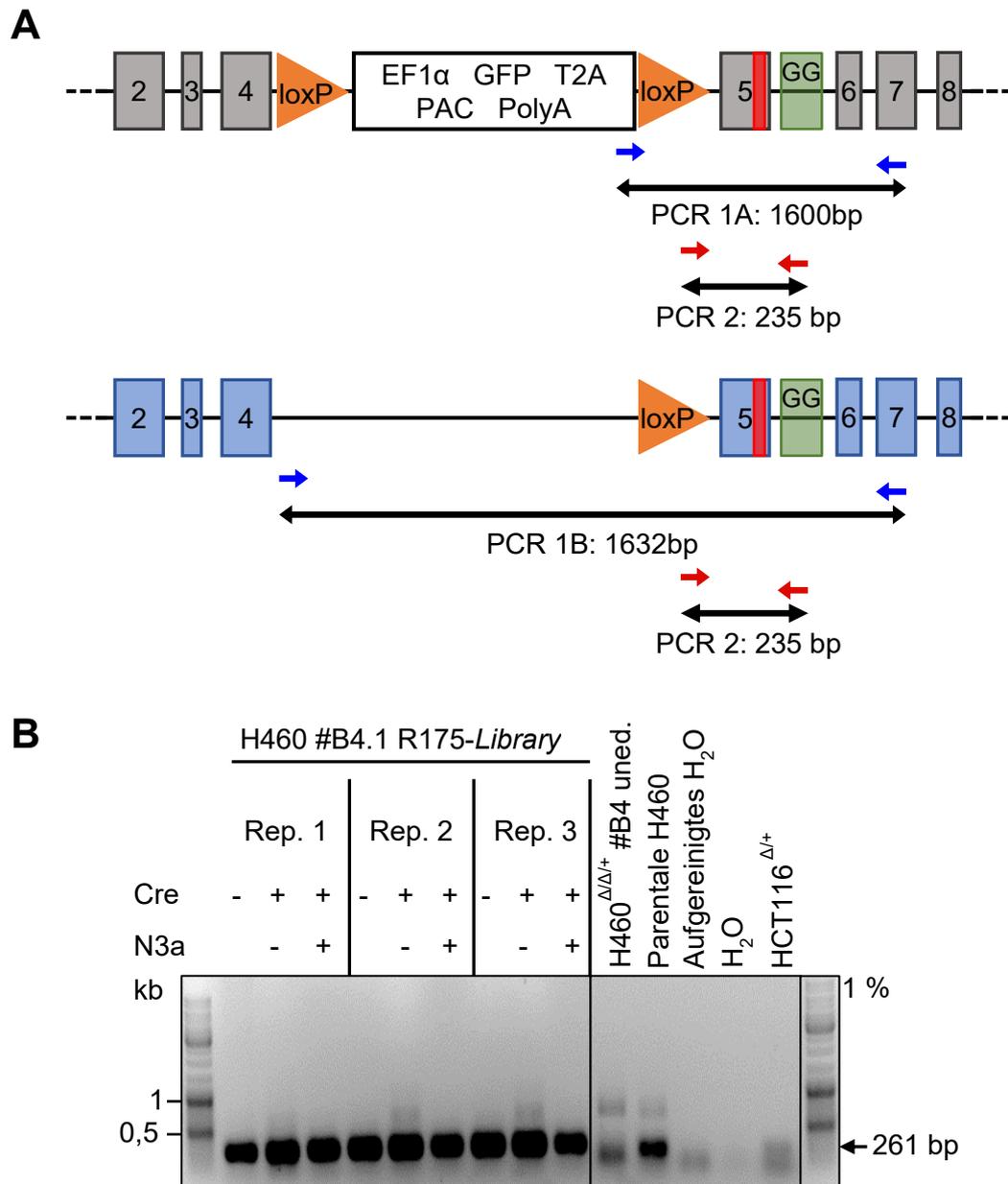


Abbildung 29: Erfolgreiche Vorbereitung der Proben für *Next Generation Sequencing* via geschachtelter PCR.

A: Schematische Darstellung der durchgeführten PCRs. PCR 1A wurde für die -Cre-Proben verwendet, PCR 1B wurde für die +Cre-Proben verwendet. PCR 2 war bei beiden Ansätzen identisch.

B: Geschachtelte PCR des Schemas aus A wurde durchgeführt und das Bandenmuster nach PCR 2 aufgetrennt in 1 %iger Agarose-Gelelektrophorese. Die erwartete Bande von 261 bp wurde markiert.

Rep. = Replikate; uned. = Klon vor Transfektion mit R175-Mutationen.

Bei der Auswertung der NGS-Daten wurden zunächst die Daten vor AdenoCre-Infektion („-Cre“) mit den Vektor-Rohdaten verglichen. Die Daten von letzterem wurden bereits von J. Funk (AG Stiewe) akquiriert, indem die Vektor-*Library* als *template*-DNA per PCR amplifiziert und zum NGS gesendet wurde. Dadurch konnte beobachtet werden, ob sich die Häufigkeitsverteilung in der Vektor-*Library* auch in der Zell-*Library* widerspiegelt. Dafür wurden die Datenpunkte aller drei Replikate der -Cre-Proben gegen den Vektor-Datensatz aufgetragen. (Abbildung **30 A**). Hier wurde eine signifikante Pearson-Korrelation von Vektor zu -Cre von $R^2 = 0,7994$ berechnet.

Als nächstes wurden die Replikate vor AdenoCre-Infektion miteinander verglichen (Abbildung **30 B**). Bei Vergleich der relativen *Read Counts* zeigten sich signifikante Pearson-Korrelationen von $R^2 = 0,9465$; $0,8469$ und $0,8390$. Anschließend wurden die einzelnen Replikate vor AdenoCre-Infektion gegen die entsprechenden Replikate nach AdenoCre-Infektion, die mit DMSO behandelt wurden, aufgetragen (Abbildung **30 C**). Erneut wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Es zeigten sich bei den 3 Replikaten signifikante Korrelationen von $R^2 = 0,7099$; $0,1458$ und $0,7079$. Hier ist ein großer Ausreißer in Replikat 2 für die schlechte Gesamtkorrelation verantwortlich. Bei Vergleich der drei +Cre DMSO-Replikate miteinander fiel jedoch eine suboptimale Korrelation von $R^2 = 0,04861$; $0,3798$ und $0,0661$ auf (Suppl. Abbildung **III A**). Auch hier zeigten sich zwei Ausreißer-Datenpunkte in Replikat 2 bzw. 3, die zu diesen Korrelationswerten beitragen.

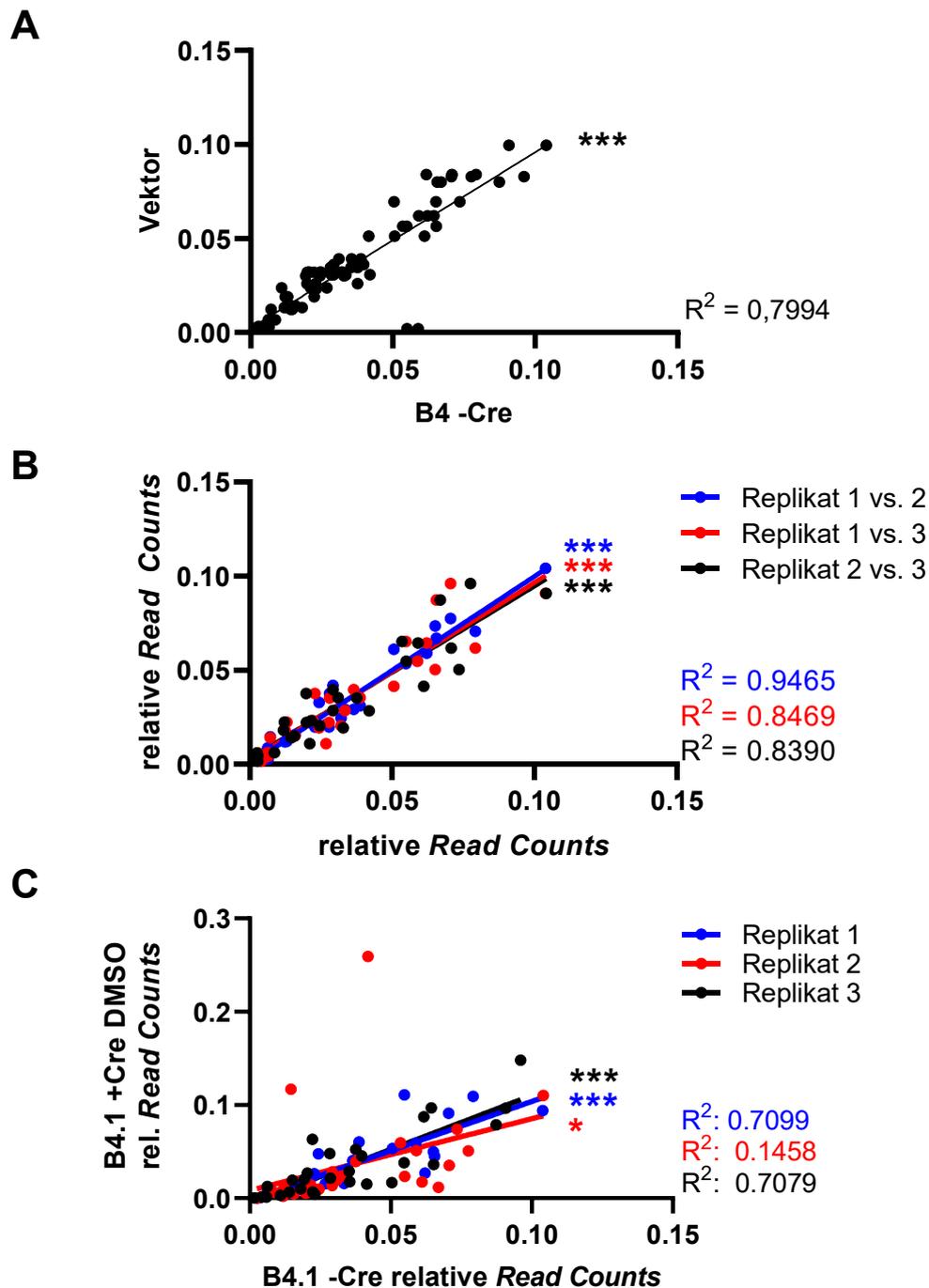


Abbildung 30: Korrelation der R175-Library-Replikate und gegenüber der Vektor-Library im Next Generation Sequencing.

A: Darstellung relativer *Read Counts* aller Datenpunkte vor AdenoCre-Infektion gegen den Vektor selbst in einem zweidimensionalen Streudiagramm mit linearer Regressionslinie.

B: Darstellung der relativen *Read Counts* aller Datenpunkte der drei Replikate vor AdenoCre-Infektion.

C: Darstellung der relativen *Read Counts* aller Datenpunkte der drei Replikaten vor AdenoCre-Infektion mit den entsprechenden Replikaten nach AdenoCre-Infektion.

R^2 entspricht der jeweiligen Pearson-Korrelation. Angabe von signifikanter Korrelation: * entspricht $p < 0,05$; ** entspricht $p < 0,005$; *** entspricht $p < 0,0005$.

Anschließend wurde der relative Fitness-Score nach Nutlin-3a-Behandlung für jede einzelne Mutante bestimmt. Dieser wird berechnet aus dem log₂-transformierten Quotienten der relativen *Read Counts* jeder Mutante unter Nutlin-3a-Behandlung geteilt durch die Kontrollbehandlung unter DMSO. Dadurch wird gezeigt, ob sich eine Mutante unter Nutlin-3a-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle an- oder abreichert. Anhand dieser Daten wurde eine *Heatmap* erstellt, die für jedes Replikat und jeder Mutante den jeweiligen relativen Fitness-Score farblich aufträgt (Abbildung 31, Suppl. Abbildung III B). Blau bedeutet hierbei eine Depletion, Rot eine Anreicherung und Weiß weder eine An- noch eine Abreicherung unter Nutlin-3a-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Behandlung. Wie erwartet zeigten hier die *frameshift*-Mutationen (FrShift) sowie die Stopp-Mutante eine Anreicherung. Auch die erwähnte *hotspot*-Mutante R175H zeigte eine Anreicherung unter Nutlin-3a-Behandlung. Die stillen Mutationen R175R zeigten wie erwartet eine Depletion unter Nutlin-3a-Behandlung. Die nicht-synonyme Mutante R175P, die zu partiellem Funktionsverlust führt, zeigte erwartungsgemäß weder An- noch Abreicherung. Zusammenfassend konnte mit diesem Pilotexperiment die Möglichkeit einer Hochdurchsatzmutagenese validiert werden. In dem Einzelzellklon #B4.1 funktioniert sowohl der Einbau einzelner Mutanten als auch das Durchführen einer saturierten Mutagenese. Somit wurde mit der erfolgreichen Generierung von H460^{Δ/Δ/LSL} #B4.1 *PuroS* der Grundstein für weitere Projekte gelegt und ein Werkzeug geschaffen, um beliebige weitere *TP53*-Mutationen auf ihre funktionellen Konsequenzen zu charakterisieren.

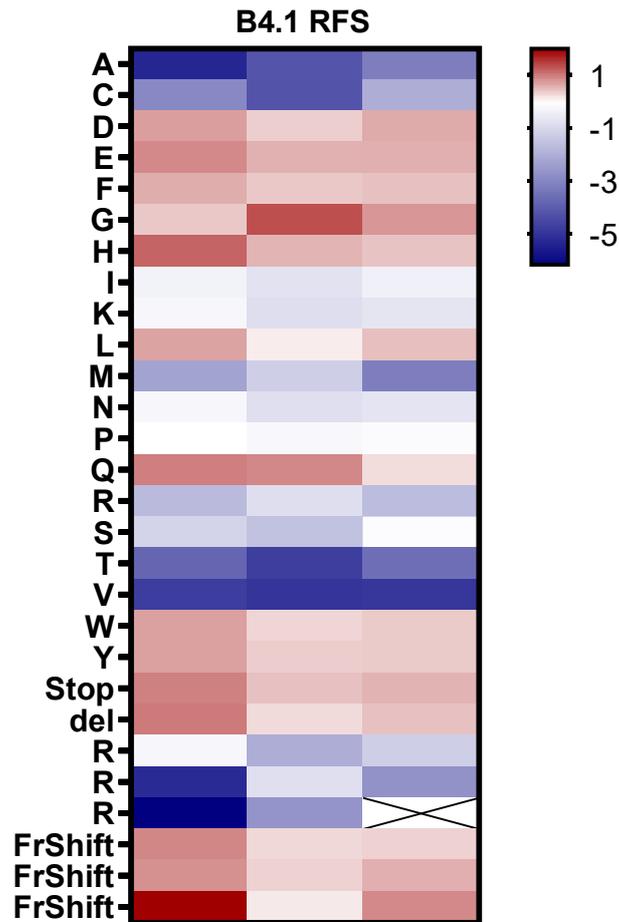


Abbildung 31: Berechnete Relative Fitness Scores der R175-Library als Heatmap.

Darstellung der Relativen Fitness Scores (RFS) der einzelnen Replikate für jede entsprechende Basensubstitution der R175-Library in einer *Heatmap*. Der RFS berechnet sich durch folgende Formel: $\log(\text{rRC N3a} / \text{rRC DMSO})$. rRC = relative *Read Counts*.

4.3. Erfolgreiche Etablierung einer effizienten Mutagenese von *TP53* durch *Base Editing* in H460 und HCT116-Zellen

4.3.1. Erste Versuche mit R273C-induzierenden sgRNAs zeigen eine sehr hohe Effizienz des *Base Editors*, Basentransitionen zu induzieren

Bevor im Rahmen dieser Arbeit Experimente mit dem *Base Editor* begonnen wurden, wurden bereits von J. Funk aus der AG Stiewe erste wichtige Erkenntnisse diesbezüglich festgestellt. Zunächst wurden die im Folgenden verwendeten beiden sgRNAs gegen das Codon R273 in Exon 8 sowie die Kontroll-sgRNA gegen das Luciferase-Gen durch Golden Gate-Klonierung generiert (im Folgenden sgR273.1, sgR273.2 und sgLuc). Diese wurden zunächst in den beiden Zelllinien H460 und HCT116^{Δ/+} getestet. Dafür wurden die 3 sgRNAs jeweils einzeln mit dem *Base Editor* (pCMV-hA3a-eBE-Y130F) kotransfiziert. Anschließend wurde ein Kolonieformationstest durchgeführt, bei dem sich in beiden sgRNAs, die gegen die *TP53*-Exon 8-Region zielen, Nutlin-3a-resistente Kolonien zeigten (Abbildung 32). Dieser erste Erfolg unter Verwendung des *Base Editors* sollte im Rahmen dieser Arbeit nun weiter fortgeführt werden.

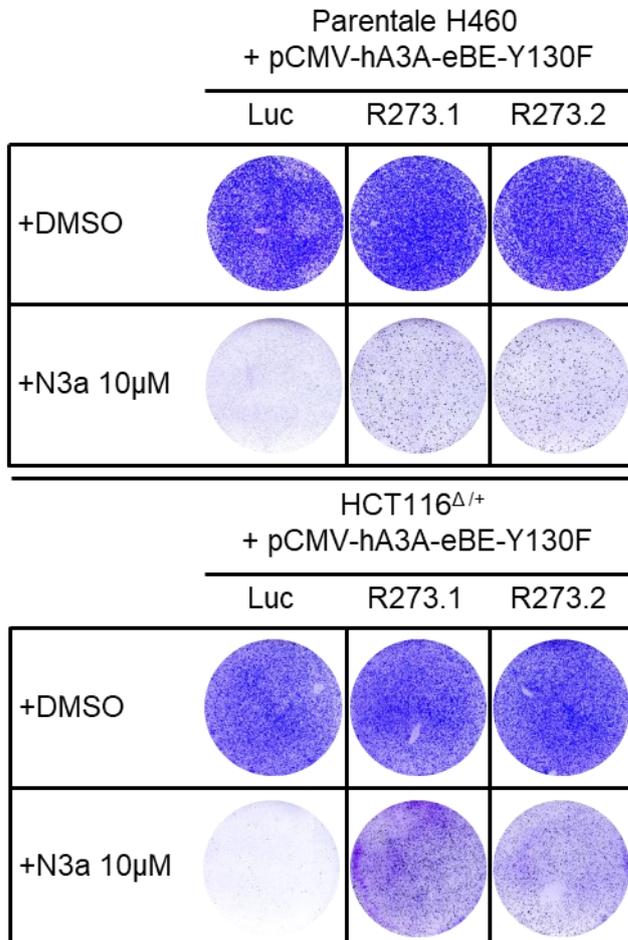


Abbildung 32: Kolonieformationstest nach initialer *Base Editor* Transfektion.

Kolonieformationstest der beschrifteten Proben nach 7 Tagen DMSO bzw. 10 µM Nutlin-3a-Behandlung. Durchgeführt von J. Funk, M.Sc., AG Stiewe.

Die erwähnten sgRNAs sgR273.1; sgR273.2 und sgLuc wurden jeweils einzeln erneut zusammen mit dem *Base Editor* pCMV-hA3a-eBE-Y130F in parentale H460-Zellen sowie in HCT116 $\Delta^{+/}$ -Zellen transfiziert. Die verwendeten sgRNAs haben in ihrem Editierungsfenster, was wie erwähnt als Base 3-8 der sgRNA definiert ist, genau eine Cytosin-Base an Stelle 3 (sgR273.1) bzw. Stelle 4 (sgR273.2). Durch eine dortige Cytosin zu Thymin Transition durch den *Base Editor* entsteht die nicht-synonyme Mutation von Arginin zu Cystein (R273C, CGT zu TGT). R273C ist nach R175H die zweithäufigste klinische Mutation von p53 und somit ebenfalls von großer klinischer Relevanz (Kandoth et al. 2013). Die Kontroll-sgRNA zielt auf das Luciferase-Gen, was in humanen Zellen nicht präsent ist und somit keinen Angriffspunkt für den *Base Editor* bieten sollte. Nach 7-tägiger Nutlin-3a-Behandlung wurde zunächst eine geschachtelte PCR zur Darstellung von Exon 8 mit genomischer DNA der polyklonalen Zellen durchgeführt (Abbildung 33). Da die verwendete Zelllinie HCT116 $\Delta^{+/}$ auf dem *Knockout*-Allel eine Deletion in Intron 5 trägt, konnte mit der PCR 1 gezielt nur das aktiv exprimierende Allel amplifiziert werden. Dafür liegt der vorwärts Primer in Intron 5 innerhalb der Deletion des *Knockout*-Allels.

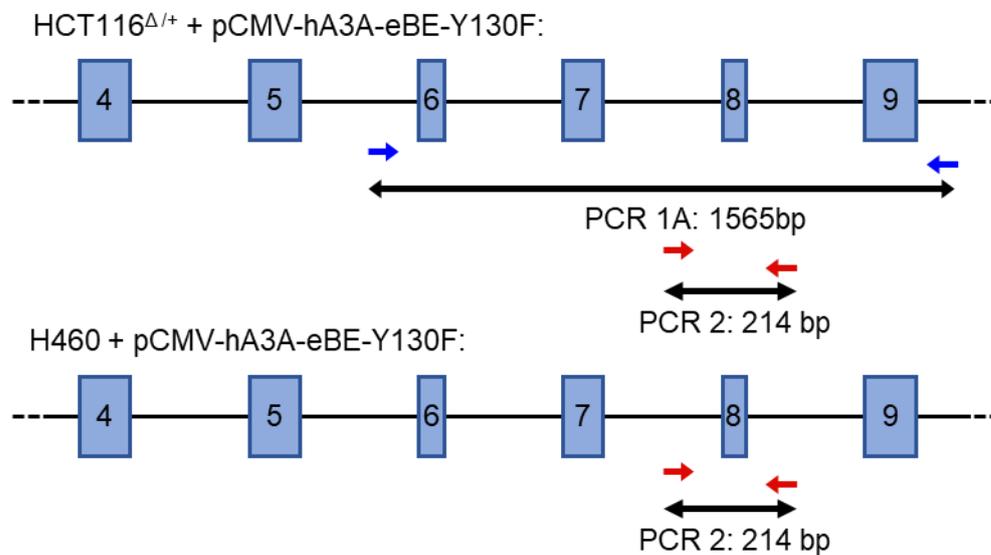
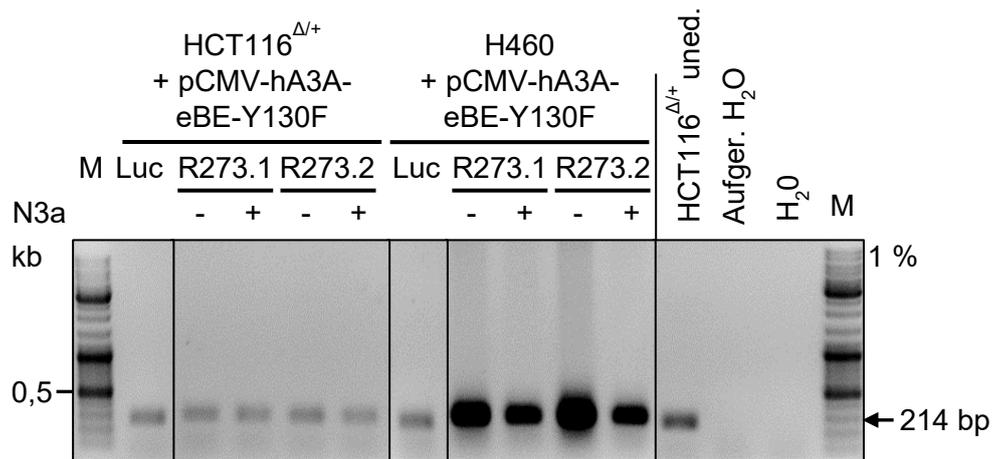


Abbildung 33: Schema der durchgeführten geschachtelten PCRs zur Darstellung von Exon 8.

Für HCT116-Zellen wurde eine geschachtelte PCR durchgeführt, um spezifisch ein Allel abzubilden. Dafür wurde in PCR 1 der vorwärts Primer in eine in Intron 5 lokalisierte Deletion eines der beiden Allele gelegt, wodurch nur das andere Allel dargestellt wurde. Dagegen wurde für H460 nur eine PCR dargestellt, da hier keine Möglichkeit der spezifischen Darstellung einzelner Allele bestand.

Anschließend wurde dieses Amplikon in PCR 2 verwendet, die nur das Exon 8 darstellt (Abbildung 34 A). Da der *Base Editor* in parentale H460-Zellen transfiziert wurde, bestand bei diesen keine Möglichkeit, nur einzelne Allele zu amplifizieren, sodass hier nur die PCR 2 durchgeführt wurde. Parallel dazu wurden aus dem polyklonalen Zellpool, der mit Nutlin-3a behandelt worden war, Einzelzellklone generiert. Insgesamt wurden so 7 Einzelzellklone der Zelllinie H460 und 6 Einzelzellklone der Zelllinie HCT116 in der gleichen Art und Weise durch PCR amplifiziert (Abbildung 35). Die Amplikons wurden anschließend durch Sanger-Sequenzierung analysiert (Abbildung 34 B). Bei dieser Sequenzierung konnte Folgendes beobachtet werden: Zunächst zeigte sich ein homogener Einbau der erwarteten Punktmutation R273C in beiden mit Nutlin-3a behandelten Zelllinien. Die mit DMSO-behandelten HCT116-Zellen, nicht jedoch den H460-Zellen, zeigten zudem bereits ein gemischtes Signal aus Wildtyp- und mutierter Sequenz. In einer Schätzung der *Base Editing*-Effizienz in den HCT116-Zellen mit dem Programm EditR (Kluesner et al. 2018) zeigten sich 55% bzw. 37% von den mit sgR273.1 bzw. sgR273.2-transfizierten polyklonalen Zellpools editiert (Daten nicht gezeigt). Dass dieser polyklonale Zellpool schon ohne Selektion mit Nutlin-3a eine solch ausgeprägte Mutation in der Sanger-Sequenzierung zeigt, gab einen ersten Hinweis auf die sehr gute Editierungseffizienz des *Base Editors* nach Transfektion. Auch alle analysierten Einzelzellklone beider Zelllinien zeigten sehr homogen die erwartete R273C-Punktmutation (Suppl. Abbildung IV A).

A



B

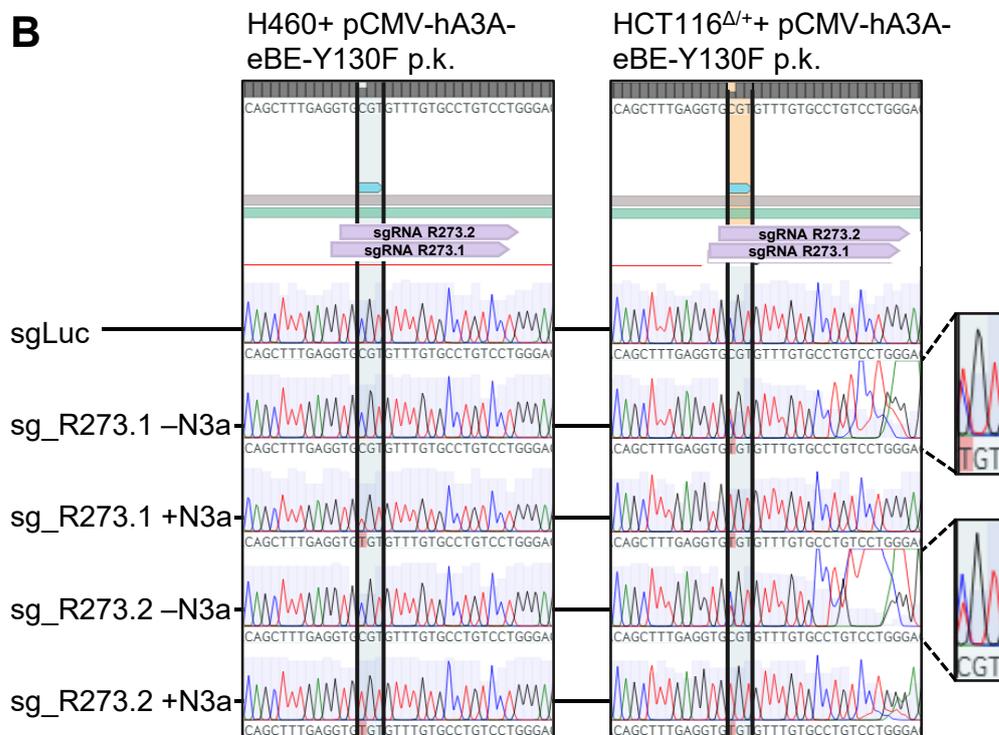


Abbildung 34: Sanger-Sequenzierung der polyklonalen Zellpools nach DMSO- bzw. Nutlin-3a-Behandlung zeigte eine sehr hohe Effizienz des *Base Editors*.

A und B: Durchführung der PCR aus Abbildung 33 mit anschließender Bandenauftrennung in 1 %iger Gelelektrophorese von polyklonalen HCT116 $\Delta^{+/+}$ bzw. H460-Zellpools (**A**) nach *Base Editor*-Transfektion. Charakterisierung der Proben durch Sanger-Sequenzierung (**B**). Hervorhebung des R273-Codons in Exon 8 von *TP53* im Zackendiagramm. Die Vergrößerung in **B** verdeutlicht die beobachtete Überlagerung von Wildtyp- und Mutantensequenz. „Luc“, „R273.1&.2“ = jeweilige transfizierte sgRNA. Uned. = uneditiert.

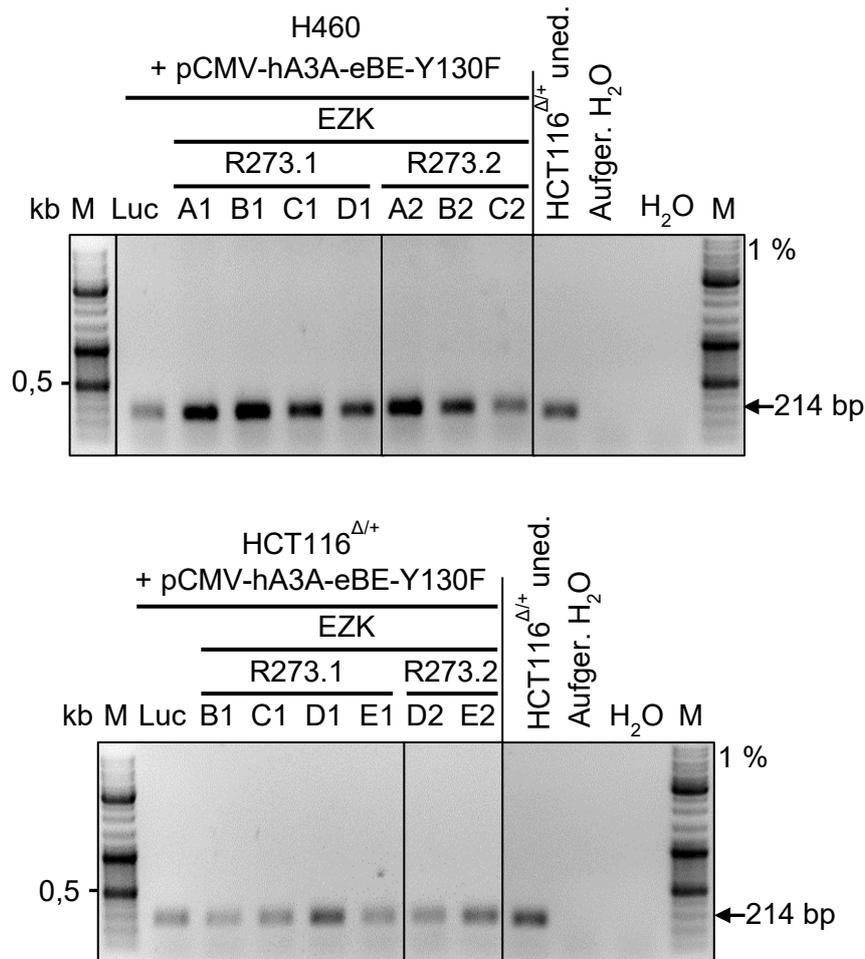


Abbildung 35: PCR zur spezifischen Darstellung des R273-Codons in *Base Editor*-transfizierten Einzelzellklonen.

Durchführung der PCR aus Abbildung 33 mit anschließender Bandenauffrennung in 1 %iger Gelelektrophorese von EZKs von HCT116^{Δ+} bzw. H460-Zellen nach *Base Editor*-Transfektion. Charakterisierung der Proben durch Sanger-Sequenzierung (Suppl. Abbildung IV).

Diese Nutlin-3a-resistenten Einzelzellklone wurden nun weiter analysiert. Hier war das Ziel, die aktive Expression der Mutante nachzuweisen. In einer durchgeführten Sanger-Sequenzierung der cDNA zeigte sich analog zu der Sequenzierung genomischer DNA die R273C-Mutante in allen 13 Einzelzellklonen. (Suppl. Abbildung IV B).

Anschließend wurde ein Western Blot der Einzelzellklone durchgeführt, um die p53-Expressionslevel, sowie die mögliche Expression von den Effektorproteinen p21 und Mdm2 zu beurteilen (Abbildung 36). Hier wurden nun unbehandelte R273C-Einzelzellklone mit Nutlin-3a-behandelten parental H460- bzw. HCT116^{Δ+}-Zellen verglichen. Im Western Blot zeigte sich eine p53-Expression aller Einzelzellklone. Vor

allein die H460-Zellen zeigen unbehandelt ähnlich hohe p53-Expression wie die Nutlin-3a-behandelte Kontrolle. Obwohl der Western Blot nur ein semiquantitatives Verfahren ist (Mahmood und Yang 2012), kann hier von einer Stabilisierung der Mutante in den H460-Zellen ausgegangen werden. Wichtig zu erwähnen ist außerdem das erwartungsgemäße Ausbleiben einer Mdm2- oder p21-Induktion in Einzelzellklonen mit der *hotspot*-Mutation.

Die p53-Bande der H460-Einzelzellklone schien jedoch etwas niedriger zu laufen als die der parentalen H460-Kontrolle. In einem siRNA-*Knockdown* von p53 wurde deshalb die p53-Spezifität dieser Bande bestätigt (Suppl. Abbildung V).

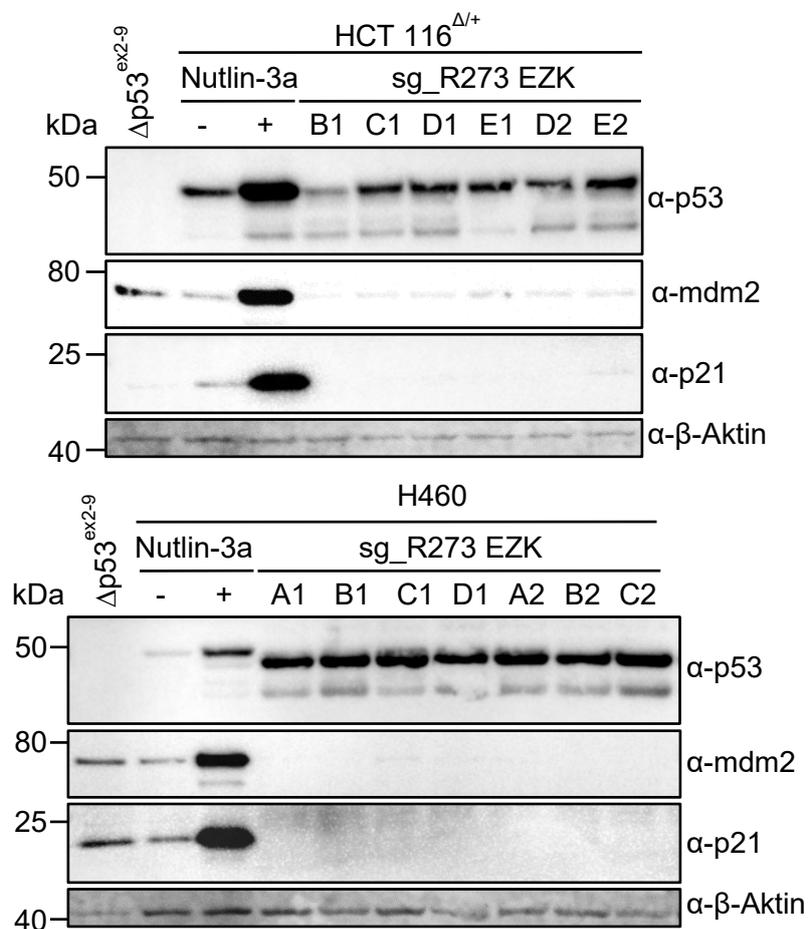


Abbildung 36: Western Blot zeigte Stabilisierung der exprimierten p53-Mutante in R273C-mutierten Einzelzellklonen.

Western Blot zur Darstellung der p53-, Mdm2- und p21- Expression der unbehandelten R273C Einzelzellklone. Parentale H460 bzw. HCT116^{Δ/+} nach 24 h 10 μM Nutlin-3a oder DMSO-Behandlung („- Nutlin-3a“) dienten als Kontrolle. Als Negativkontrolle dienten Zellen mit p53-Deletion von Exon 2 – 9. Die Aktin-Expression diente als Ladekontrolle.

4.3.2. Die erfolgreiche Generierung und Anwendung des *Base Editors* mit 27 sgRNAs an Exon 8 von *TP53*

Da nun nachgewiesen wurde, dass dieser *Base Editor* sehr effizient funktioniert, wurde dieser als nächstes in einem etwas größeren Maßstab verwendet. Dafür wurden in Exon 8 alle PAM-Sequenzen („NGG“) identifiziert (Abbildung 37). Zusätzlich wurden alle PAM-Sequenzen um Exon 8 herum identifiziert, deren Editierungsfenster zumindest teilweise in Exon 8 lokalisiert ist. Als Beispiel kann hier sgRNA #8 angeführt werden, die ihre PAM-Sequenz außerhalb von Exon 8 besitzt, sich das Editierungsfenster jedoch innerhalb von Exon 8 befindet (Abbildung 38 A). Insgesamt wurden so 27 mögliche sgRNAs in und um Exon 8 erfasst. Diese beinhalten auch die schon gezeigten sgR273.1 und sgR273.2. Diese entworfenen sgRNAs wurden nun als *annealed* Oligonukleotid durch GoldenGate-Klonierung in den bestehenden Vektor (pGL3_U6_sgRNA_PGK-puromycin) kloniert (Abbildung 38 B).

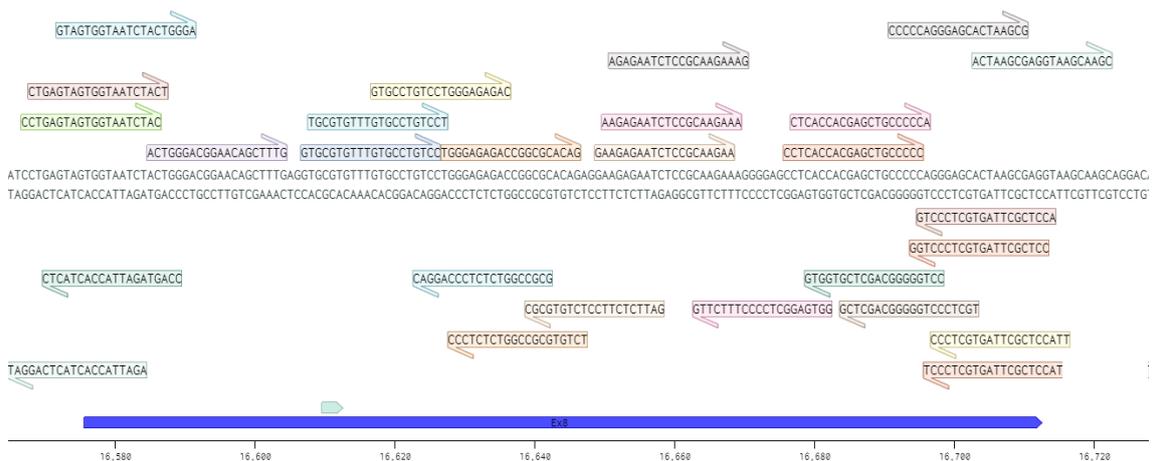


Abbildung 37: Überblick aller 27 verwendeten sgRNAs des *Base Editor*-Experiments.

Die Pfeilspitze markiert das jeweilige 3'-Ende der sgRNA, der sich eine „NGG“ PAM-Sequenz anschließt.

Nach Amplifikation und Aufreinigung der Klonierungsprodukte wurde der erfolgreiche Einbau der sgRNA in den Vektor durch Kontrollverdau und Sanger-Sequenzierung validiert (Suppl. Abbildung VI und Suppl. Abbildung VII). Hier zeigte sich bei sgRNA #11 eine Deletion, sodass diese von den Experimenten ausgeschlossen wurde (Daten nicht gezeigt). In sgRNA #24 zeigte sich eine Überlagerung der Peaks mit einer anderen sgRNA. Diese wurde trotzdem, wie auch die 25 anderen sgRNAs für das weitere Vorgehen verwendet.

Die 26 aufgereinigten Vektoren, die die sgRNAs beinhalten, wurden jeweils zusammen mit dem *Base Editor* in HCT116^{Δ/+}-Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente erneut die bereits erwähnte sgLuc. Anschließend wurde ein Kolonieformationstest nach Nutlin-3a-Behandlung durchgeführt (Abbildung 39).

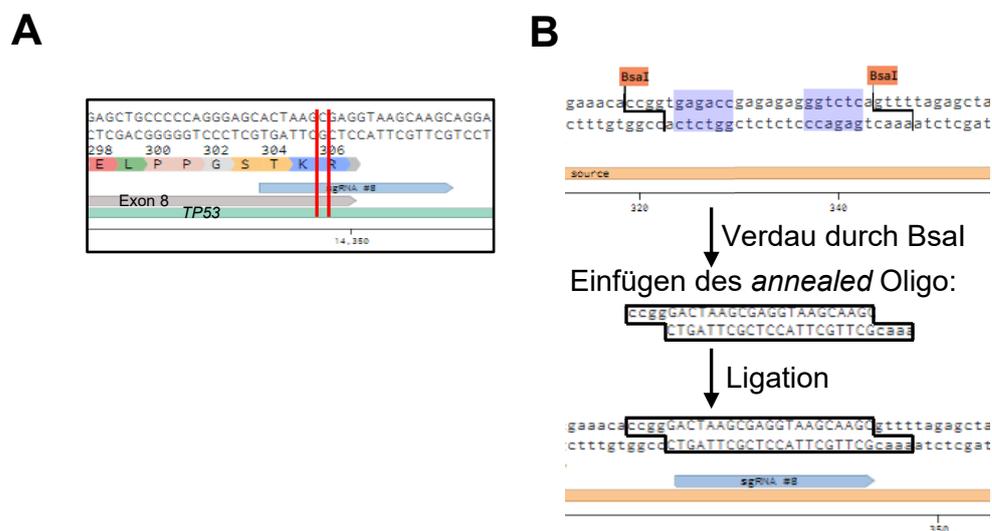


Abbildung 38: Schema der Generierung der Vektoren pGL3_U6_sgRNA_PGK_puromycin_1-27 durch GoldenGate-Klonierung.

A: Lokalisation der sgRNA #8 in Exon 8 von TP53. Im Editierungsfenster von Base 3-8 befindet sich genau eine Cytosin-Base, die hier markiert wurde.

B: Schema der durchgeführten GoldenGate-Klonierung unter Verwendung von BsaI exemplarisch an sgRNA #8.

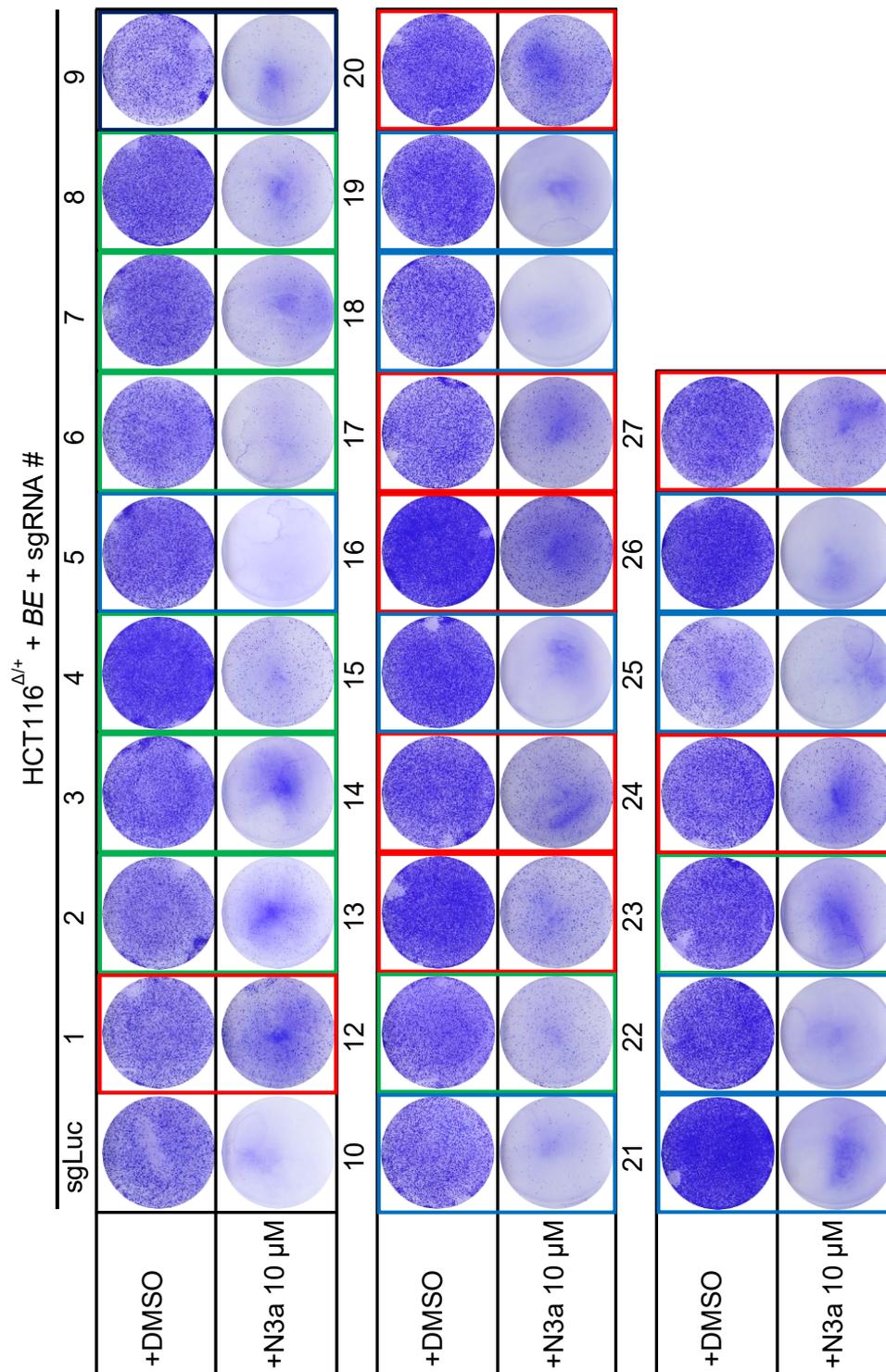


Abbildung 39: Kolonieformationstest der 26 sgRNAs nach Kotransfektion mit dem *Base Editor*.

Kolonieformationstest der polyklonalen Zellen, die mit dem *Base Editor* und der angegebenen sgRNA transfiziert wurden. Die Zellen wurden vor Fixation für 9 Tage mit 10 μM Nutlin-3a oder DMSO als Kontrolle behandelt. Zusätzlich wurde eine Aufteilung in drei Kategorien vorgenommen, je nach der optischen Anzahl an Nutlin-3a-resistenten Kolonien. Die rote Gruppe (Gruppe 1) zeigte die meisten Kolonien, Grün (Gruppe 2) vereinzelte Kolonien und Blau (Gruppe 3) keine oder kaum Kolonien.

Die mit Nutlin-3a-behandelten Platten der 26 sgRNAs wurden in drei Gruppen kategorisiert. In die erste Gruppe wurden jene sgRNAs aufgenommen, die viele Nutlin-3a-resistente Kolonien bildeten. Darunter zählten sgRNA #1, #13, #14, #16, #17, #20, #24 und #27. Die zweite Gruppe beinhaltet sgRNAs, welche zusammen mit dem *Base Editor* einige Nutlin-3a-resistente Kolonien generiert haben, jedoch deutlich weniger als in Gruppe 1. Darunter zählten sgRNA #2, #3, #4, #6, #7, #8, #12 und #23. In Gruppe 3 waren alle sgRNAs, die nach der Transfektion kaum oder keinerlei Nutlin-resistente Kolonien generiert haben.

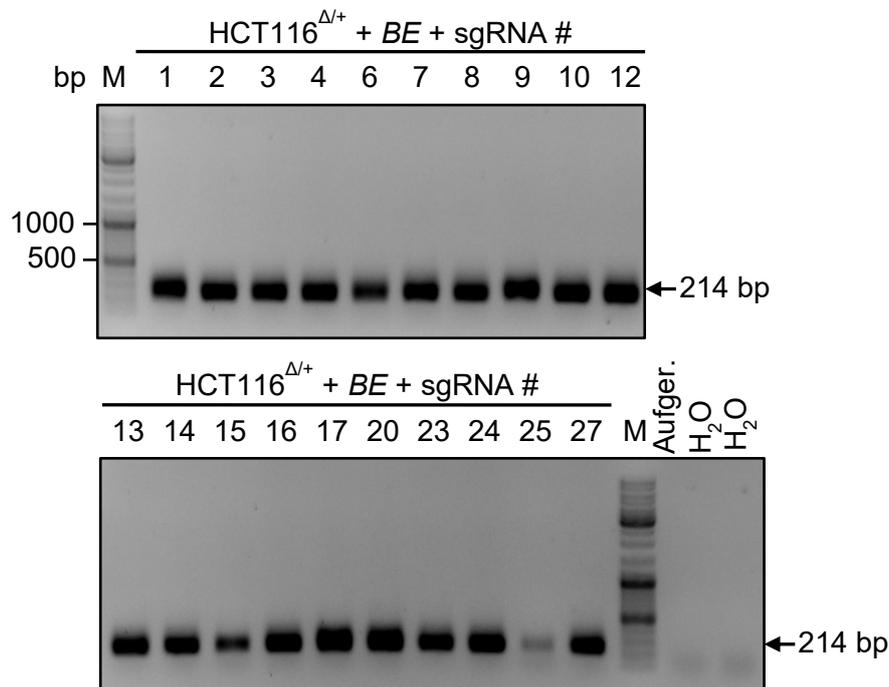


Abbildung 40: Analyse der gDNA Nutlin-resistenter Zellen nach Transfektion durch spezifischer geschachtelter PCR.

Nach Isolation genomischer DNA aus entsprechenden Nutlin-resistenten Zellen wurde eine geschachtelte PCR nach dem Schema aus Abbildung 33 durchgeführt und anschließend das Bandenmuster in einer 1 %igen Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.

Anschließend wurde die genomische DNA der mit Nutlin-3a behandelten Zellen untersucht. Diese wurde dann durch eine bereits erwähnte geschachtelte PCR amplifiziert (Abbildung 40; Abbildung 33). Von den so generierten Amplikons konnte nun durch Sanger-Sequenzierung die jeweilige induzierte Mutation charakterisiert werden (Tabelle 17, Suppl. Abbildung VIII). In der erwähnten Gruppe 1 konnten 7/8 der induzierten Mutationen klar identifiziert werden. Hierbei fällt auf, dass diese Gruppe aus klinisch bekannten Mutationen (vgl. Bouaoun et al. 2016; TCGA Research Network) oder aus

induzierten Deletionen besteht. Deletionen treten nur in Gruppe 1 auf mit einer 24 bp langen Deletion am Anfang von Exon 8 in den mit sgRNA #1 transfizierten Zellen sowie einer 4 bp langen Deletion in den mit sgRNA #24 transfizierten Zellen, die zu einem *frameshift* führt. Bei der großen Deletion kommt es, da diese am *downstream*-Ende des Introns beginnt, wahrscheinlich über einen Defekt der Splicing *Acceptor Site* zu Splicing-Defekten (Baten et al. 2006). Diese können zu einem *frameshift* führen, was die Nutlin-3a-Resistenz erklärt. Bei den nicht-synonymen Punktmutationen fallen zunächst die beiden bereits bekannten sgRNAs #14 und #27 auf, die die R273C-Mutation induzieren. Andere Zellen aus Gruppe 1 zeigten meist mehrere simultane Mutationen. In Gruppe 2 sind zunächst die mit sgRNA #3 transfizierten Zellen zu nennen, in denen eine weitere *hotspot*-Mutation festgestellt wurde, R282W. Diese ist die am sechsthäufigsten beobachtete *TP53*-Mutation in menschlichen Karzinomen (Bouaoun et al. 2016). Zudem wird in den mit sgRNA #8 transfizierten Zellen die Mutation R306* beobachtet. Diese steht in den klinisch am häufigsten beobachteten *TP53*-Mutationen an Platz 13 (Bouaoun et al. 2016). Ansonsten sind die beobachteten Mutationen in Gruppe 2 und 3 entweder nicht klinisch bekannt oder es konnte keine Mutation ausgewertet werden, da nicht genügend genomisches Material nach Nutlin-3a-Selektion zur Verfügung stand.

sgRNA#	Mutation	Position auf der sgRNA 5'→3'	Klinische Häufigkeit
●1	24 bp am Anfang von Ex8	12	
●2	K305K R306Q A307T	6 4 1, 2	Nicht bekannt Nicht bekannt Nicht bekannt
●3	R282W	11	2,06 % (6. Häufigste Mutation)
●4	K305K R306Q A307T	7 5 2, 3	Nicht bekannt Nicht bekannt Nicht bekannt
●5			
●6	P301L	5	Nicht bekannt
●7	G262S	8	Nicht bekannt
●8	R306*	7	0,76 % (13. Häufigste Mutation)
●9	keine induzierte Mutation		

●10	K291K	15	Nicht bekannt
●12	E287*	5	0,09 %
●13			
●14	R273C	3	2,87 % (2. Häufigste Mutation)
●15			
●16	D281K	9	Nicht bekannt
	R282Q	5	0,02 %
	R283H	2	0,02 %
	E285K	-4	0,55 % (21. Häufigste Mutation)
●17	P278S	9	0,34 % (46. Häufigste Mutation)
●18			
●19			
●20	R283H	7	0,02 %
	E285K	2	0,55 % (21. Häufigste Mutation)
●21			
●22			
●23	R306Q	7	Nicht bekannt
	In8-Mutation	4	
●24	4 bp Deletion am Ende von Ex8	8	
●25			
●26			
●27	R273C	4	2,87 % (2. Häufigste Mutation)

Tabelle 17: Übersicht aller beobachteten Mutationen nach Analyse der gDNA der 26 Nutlin-3a-resistenten polyklonalen Zellpools nach *Base Editor*-Transfektion durch Sanger-Sequenzierung.

Die Farben entsprechen der Aufteilung in drei Kategorien, je nach der optischen Anzahl an Nutlin-3a-resistenten Kolonien im CFA aus Abbildung 39: Die rote Gruppe (Gruppe 1) zeigte die meisten Kolonien, Grün (Gruppe 2) vereinzelte Kolonien und Blau (Gruppe 3) keine oder kaum Kolonien.

Klinische Häufigkeit nach Bouaoun et al. (2016).

Alle Befunde zusammen betrachtet, fallen hier folgende Aspekte auf: Insgesamt wurden 25 Punktmutationen und 2 Deletionen beobachtet, die alle auf eine Cytosin-zu-Thymin Baseneditierung zurückgeführt werden konnten. Mit 16/27 (59,3 %) validierten Mutationen befand sich der Großteil, jedoch nicht alle beobachteten Mutationen in dem erwähnten Editierungsfenster der sgRNA von Base 3-8.

25/27 (92,6 %) der Mutationen konnten im Fenster von Base 1-12 der sgRNA beobachtet werden, eine Mutation befindet sich an Position -4 und eine an Position 16. Auffällig war

zudem, dass 4 der beobachteten Basensubstitutionen an Position 2 der sgRNA stattfanden, was in dieser Häufigkeit sonst nur an Position 5 und 7 der Fall war. Bei Betrachtung aller Cytosin-Basen, die sich im Editierungsfenster 3-8 der sgRNA befinden, zeigten sich 16/23 (69,6 %) dieser Cytosine editiert. Nach Ausweitung des Editierungsfensters auf Base 1-12 der sgRNA waren 25/54 (46,3 %) der Cytosin-Basen editiert.

Zusätzlich wurde die Transitionseffizienz an CpG-Sequenzen betrachtet. Hier zeigten sich insgesamt 10/11 (90,9 %) CpG-Sequenzen im Editierungsfenster der Base 1-12 und 8/8 CpG-Sequenzen im Editierungsfenster der Base 3-8 der sgRNA als editiert. Bei Betrachtung weiterer Basen, die auf ein Cytosin-Nukleotid in dem Editierungsfenster von Base 1-12 folgten, zeigte sich eine relative Ineffizienz bei Editierung eines Cytosins vor einem Thymin (CpT, 8/21, 38,1 %) oder Cytosin (CpC, 5/19, 26,3 %), bei einem Adenin auf das Cytosin wurde recht effizient editiert, allerdings kommt dieses Dinukleotid in der untersuchten DNA selten vor (CpA 2/3, 66,7 %) (Abbildung 41, links). Bei Analyse der Basen vor einem Cytosin in dem Editierungsfenster von Base 1-12 waren GpC- (8/15, 53,3 %) und TpC-Sequenzen (8/13, 61,5 %) im Vergleich zu CpC- (6/18, 33,3 %) und ApC-Sequenzen (3/8, 37,5 %) deutlich bevorzugt editiert (Abbildung 41, rechts).

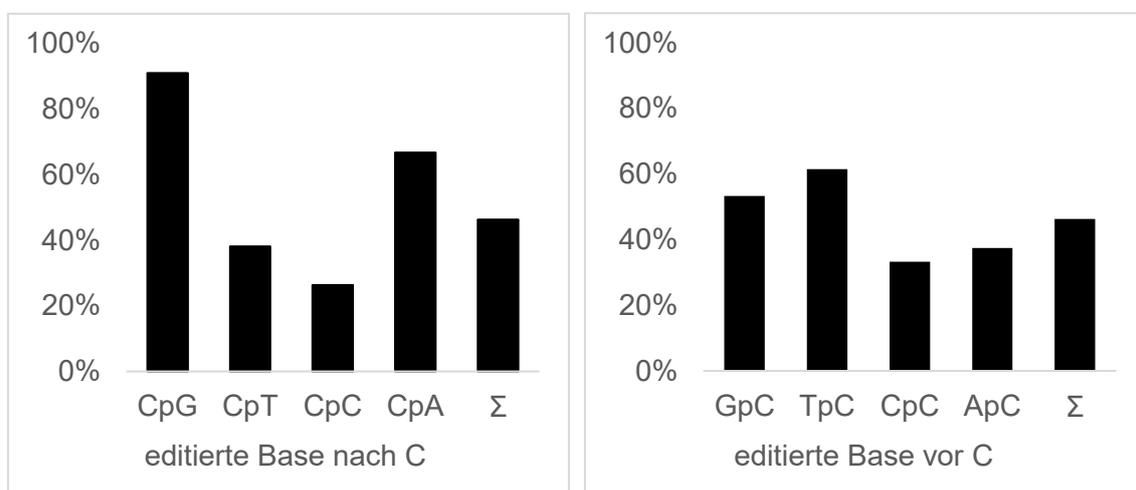


Abbildung 41: Prozentuale Abbildung aller Cytosin-Basen (C) im Editierungsfenster von Base 1-12 bei Betrachtung der Base vor bzw. nach dem C.

Zuletzt wurde beim Vorliegen mehrerer nicht-synonymer Mutationen in einem Zellpool untersucht, ob jedes Allel jeder Zelle diese Editierung trägt oder ob verschiedene Zellen nur einzelne Mutationen tragen. Dafür wurden exemplarisch die mit sgRNA #16 transfizierten Zellen analysiert, die in der Sanger Sequenzierung die vier Mutationen

D281K, R282Q, R283H und E285K zeigten (Tabelle 17). Die genomische DNA dieser Zellen wurde in der PCR nach Abbildung 33 amplifiziert und TOPO-kloniert. Die anschließende Sanger-Sequenzierung dieser Mini-Präparationen zeigte alle 4 Mutationen auf allen sequenzierten Allelen (Abbildung 42). Abschließend kann so festgestellt werden, dass der *Base Editor* sehr effizient an den durch die sgRNA ermöglichten Stellen der DNA-Sequenz die Baseneditierung durchführt. Bei mehreren verfügbaren Cytosin-Basen im Editierungsfenster kann es zu mehreren C>T Transitionen kommen. Es besteht jedoch nur eine geringe Prädiktabilität, welche Cytosin-Basen im Editierungsfenster editiert werden würden und welche nicht. Diejenigen Cytosin-Basen, die jedoch durch den *Base Editor* desaminiert wurden, sind sehr effizient in einem Großteil aller Zellen eines polyklonalen Zellpools editiert.

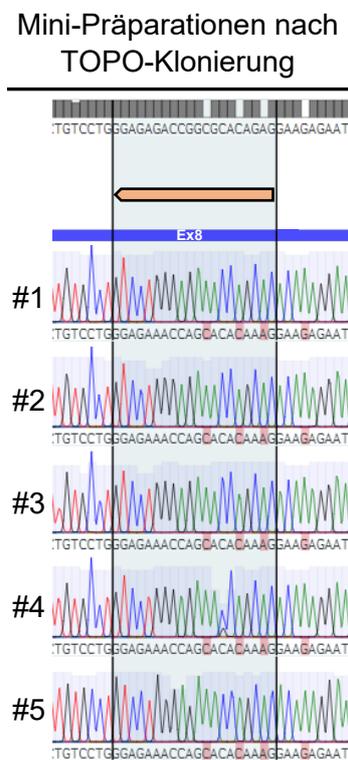


Abbildung 42: TOPO-Klonierung der mit sgRNA#16 und *Base Editor* transfizierten Zellen.

Sanger-Sequenzierung von generierten Mini-Präparationen aus den mit *Base Editor* und sgRNA #16-transfizierten Zellen. Diese wurden nach TOPO-Klonierung aus Amplikons der geschachtelten PCR aus Abbildung 40 präpariert. Darstellung von 5 exemplarischen Minis aus einer Gesamtanzahl von 24 Minis.

5. Diskussion

5.1. Die erfolgreiche Etablierung einer H460^{Δ/Δ/LSL} *PuroS* – Zelllinie mit anschließender Mutagenese des R175-Codons

5.1.1. Der Einbau der LSL-Kassette in parentale H460-Zellen durch CRISPR/Cas9 und HDR ist gelungen

TP53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Krebserkrankungen (Kandoth et al. 2013). Die enorme Vielfalt des Verhaltens unterschiedlicher p53-Mutanten machen eine spezifische Therapie gegen mutiertes p53 bis heute sehr schwer. Deshalb ist umso mehr eine genaue Charakterisierung einzelner p53-Mutanten von Bedeutung, um ein tiefgreifenderes und verbessertes Verständnis von diesen gewinnen zu können. *In vitro* können so verschiedene Behandlungsmöglichkeiten gegen die p53-mutierten Tumorzellen getestet werden, was abhängig von deren Verhalten in der Optimierung derzeitiger Therapieoptionen resultieren kann.

Der größte und wichtige Teil dieser Arbeit war die Etablierung eines H460-Zellklons mit induzierbarer, monoallelischer p53-Expression, der durch CRISPR/Cas9 und HDR modifiziert werden kann. Dieses Ziel wurde erreicht, es wurde ein Puromycin-sensitiver H460^{Δ/Δ/LSL}-Zellklon generiert. Dadurch können hier über einen Vektor mit intaktem *pac* und anschließender Selektion spezifische Mutationen in den endogenen *TP53*-Lokus eingebaut werden. Die dann nach AdenoCre-Infektion entstandenen Zellen exprimieren aktiv mutiertes p53 (vgl. Abbildung 18).

In dieser Arbeit wird mut-p53 in den H460-Zellen von einem Allel vom endogenen Locus aus exprimiert. Auch physiologisch kann dies der Fall sein, indem ein Allel mutiert vorliegt und im Verlauf das andere, intakte Allel z.B. im Rahmen der Zellteilung verloren geht (sog. LOH, *loss of heterozygosity*) (Nichols et al. 2020). Üblicherweise liegen bei der Tumorgenese jedoch zwei mutierte Allele des Tumorsuppressors vor (Weinberg 2014, S. 239–241). Im Sonderfall des dominant-negativen Effekts inhibiert mut-p53 das Wildtyp-Allel, somit wird die Mutante hier auch von nur einem Allel exprimiert (Boettcher et al. 2019).

Dennoch kann das in dieser Arbeit beobachtete Verhalten von Mutanten, die von einem Allel aus exprimiert werden, wahrscheinlich als physiologischer betrachtet werden als die artifizielle Überexpression von mut-p53 in zuvor p53-*null*-Zellen (vgl. Kotler et al. 2018). Im Gegensatz zu dieser häufigen Herangehensweise wurde p53 und dessen Mutationen

in dieser Arbeit nur vom natürlichen Promoter aus dem endogenen Locus exprimiert und ist somit Teil physiologischer Regulationskreise. Entgegen der artifiziellen Überexpression wurde hier also eher eine „Unterexpression“ der Mutante induziert. Effekte, die hier beobachtet wurden, sind demnach unter Umständen noch ausgeprägter in Tumorzellen mit zwei oder mehr mutierten *TP53*-Allelen.

Mut-p53 wird in Tumorzellen aktiv unter anderem durch sog. HSPs (*heat shock proteins*), insbesondere HSP90, stabilisiert, indem dieses die mut-p53-Konformation stabilisiert und die Polyubiquitinierung durch Mdm2 inhibiert (Li et al. 2011). Trotz aktiver Stabilisierung könnte die Akkumulation von mut-p53 geringer sein als in Tumorzellen, bei denen mut-p53 von zwei Allelen exprimiert wird.

Prinzipiell bestand nach jedem Schritt der Generierung des Zellklons die Möglichkeit unvorhersehbarer Ereignisse auf genetischer Ebene, weshalb es enorm wichtig für den Erfolg dieser Arbeit war, jeden Einzelschritt des Prozesses zu kontrollieren und zu validieren. Dies war essenziell, um etwaige Fehlerquellen möglichst direkt zu erkennen und darauf reagieren zu können. Von besonderem Interesse waren hier die GFP-Expression und die Puromycin-Resistenz bzw. -Sensitivität als wichtige Marker für ein positives Resultat eines Experiments, sodass diese nach jedem Schritt kontrolliert wurden. Bei erfolgreichem Einbau der LSL-Kassette wird eine Fluoreszenz und Puromycin-Resistenz vermittelt. Die Puromycin-Resistenz wurde als Selektionsmarker der Transfektionen benutzt. In dieser Arbeit wurde für die neu erlangte Puromycin-Resistenz durch die LSL-Kassette 7 Tage lang mit 1 µg/ml Puromycin selektioniert. Dies zeigte eine deutlich erhöhte Effizienz und einen geringeren Anteil nicht-edierter Zellen im Vergleich zu einer 3-tägigen Selektion (Daten nicht gezeigt). Da *pac* von dem exogenen EF1a-Promoter exprimiert wird, kann kurzfristig eine Puromycin-Resistenz vermittelt werden, ohne dass eine stabile Integration in das Genom stattgefunden hat. Durch eine längere Puromycin-Selektion kann dies ausgeschlossen werden, da sich das transient transfizierte Plasmid nicht mehr in den Zellen befindet. Hier könnte gegebenenfalls durch eine 10-14-tägige Selektion oder einer 2-fachen Selektion mit zwischenzeitlicher Pause (etwa 5 Tage Selektion – 3 Tage Pause – 5 Tage Selektion) die Editierungseffizienz weiter erhöht werden. Mit einer Erhöhung der Puromycin-Konzentration sollte eher zurückhaltend vorgegangen werden, da auch unter 1 µg/ml Puromycin bereits viele Zellen nach Transfektion starben.

Nach der Generierung Puromycin-sensibler LSL-Kassetten-tragender Zellen (s. 4.1.5) wurde die neu erworbene Puromycin-Sensitivität mehrmals in der Zellkultur geprüft

(4-maliges Testen auf unterschiedlichem Plattenformaten und Objektivierung per Kolonieformationstest (Abbildung 20)). Hierbei wurde nur mit Zellklonen weitergearbeitet, die in allen dieser Experimente nach 3 Tagen Inkubation keine vitalen Zellen mehr zeigten.

Generell kann es jedoch im Rahmen von CRISPR/Cas9 immer wieder zu *off-target*-Effekten kommen, bei denen die sgRNA Cas9 zu anderen Stellen des Genoms führt und dort ein unerwünschter Doppelstrangbruch entsteht (Zhang et al. 2015).

Das Risiko für das Übersehen von *off-target*-Effekten an *TP53* selbst wurde zwar minimiert, dennoch wären *off-target*-Doppelstrangbrüche an anderen Stellen des Genoms mit daraus resultierenden Deletionen oder *Mismatches* immer noch möglich. Diese könnten z.B. über einen T7 Endonuklease I Assay festgestellt werden, bei dem jedoch weder *off-target*-Effekte mit einer Frequenz $<1\%$, noch große Deletionen nach NHEJ festgestellt werden können (Kim et al. 2009). Da hierfür jedoch eine spezifische PCR notwendig ist, sind diese Analysen auf zuvor bestimmte Stellen des Genoms beschränkt. Hier können mögliche *off-target*-Effekte mithilfe von bestimmten Algorithmen vorhergesagt werden (Haeussler et al. 2016). Für eine höhere Sensitivität könnten stattdessen z.B. Integrase-defekte lentivirale Vektoren (ITLV) (Wang et al. 2015) oder *Deep Sequencing* (Cho et al. 2014) angewendet werden, was jedoch den Rahmen dieser Arbeit überschritten hätte.

Insgesamt ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von *off-target*-Effekten abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. dem korrekten sgRNA-Design (Zhang et al. 2015). Hier kann etwa durch Web-basierte Softwares, die *off-target*-Scores (Hsu et al. 2013), sowie *on-target*-Scores (Doench et al. 2016) der entworfenen sgRNA erheben, das Auftreten unerwünschter Effekte gesenkt werden. Der *off-target*-Score wurde mithilfe des Programms *Benchling* nach Hsu et al. (2013) errechnet und betrug hier bei der initial verwendeten pX330-sgRNA bezogen auf das menschliche Genom 31,5 bei 100 möglichen Punkten. Konkret wird hier betrachtet, wie viele Sequenzen genomweit mit einer Mindestanzahl von 2 *Mismatches* existieren und daraus ein Score berechnet. Von den 50 Sequenzen, die hier mit der geringsten Anzahl an *Mismatches* mit der sgRNA übereinstimmen, liegen 3 exonisch, diese haben jeweils mindestens 4 *Mismatches*. Alle anderen Sequenzen liegen intergenisch oder intronisch. Insgesamt ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von *off-target*-Effekten des CRISPR/Cas9-Systems jedoch deutlich geringer verglichen mit anderen Methoden der Genomeditierung, wie

z.B. Zinkfingernukleasen (ZFN) oder Transkriptions Aktivatorartige Effektor Nuklease (*Transcription activator-like effector nucleases*, TALEN) (Duan et al. 2014).

Die beiden Parameter Puromycin-Resistenz und GFP-Positivität sind zwar nur indirekte Surrogat-Nachweise des erfolgreichen Einbaus der gesamten LSL-Kassette, es konnte jedoch trotzdem davon ausgegangen werden, dass bei dem kombinierten Vorliegen dieser beider Parameter ein Großteil der LSL-Kassette erfolgreich eingebaut worden war. Die Begründung hierfür ist, dass bei Expression von GFP und der Puromycin-Resistenz auch der vorgeschaltete EF1 α -Promoter funktionsfähig sein musste und somit durch diese beiden Surrogat-Parameter die gesamte LSL-Kassette dargestellt wurde. Um die Funktionalität des Systems trotzdem sicher zu stellen, wurde zusätzlich wie beschrieben, die AdenoCre-Infektion an den Zellen mit Wildtyp-Sequenz geprüft (Abbildung 18). Falls die LSL-Kassette nicht vollständig eingebaut worden wäre, hätte hier keine Rekombination stattgefunden, da dies nur bei vollständiger Präsenz beider loxP-Sequenzen möglich ist. Zusätzlich gab die im Verlauf immer wieder nachgewiesene Resistenz gegen den Mdm2-Inhibitor Nutlin-3a (Abbildung 20) eine Bestätigung auf ein tatsächliches Vorliegen dreier *TP53-Knockout*-Allele.

Als zusätzliche Kritik in der Zellkultur ist außerdem zu erwähnen, dass zum Teil mit recht hohen Konfluenzen gearbeitet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Konfluenz von Zellen die Expression von Proteinen und den Metabolismus der Zellen verändern kann (Han et al. 2006; Chacko und Eliceiri 2019). H460-Zellen zeigten in dieser Arbeit eine sehr schnelle Proliferation, wodurch sie meist bereits nach 48-stündiger Inkubation wieder eine 80-90 %ige Konfluenz hatten. Jedoch wurde darauf geachtet, dass Zellen vor einer Transfektion oder Infektion eine Konfluenz von maximal 75 % erreicht hatten. Für weitere Experimente der Zellkultur konnte eine 80-90 %ige Konfluenz nicht immer verhindert werden. Eine höher frequentierte Passagierung bzw. eine Passagierung mit höherer Verdünnung der Zellen war darüber hinaus nicht möglich, da zu jeder Zeit eine ausreichende Anzahl an Zellen, d.h. eine bestimmte *Coverage*, zur Validität der Ergebnisse benötigt wird. Alle Kontrollen wurden gleichbehandelt, sodass hier eine verfälschende Auswirkung auf das Endergebnis unwahrscheinlicher gemacht wurde. Eine übermäßige Konfluenz darüber hinaus wurde in allen Experimenten vermieden.

5.1.2. Die Rekombinationseffizienz bei AdenoCre-Infektion wird durch Optimierung der Methodik deutlich gesteigert

Nach Infektion der Zellen mit dem Adenovirus mit Cre-Rekombinase (AdenoCre) schwankte die Rekombinationseffizienz je nach Experiment und es konnte nicht immer eine ideale Rekombination erreicht werden. Während bei der initialen AdenoCre-Infektion, die in einer *TP53*-Wildtyp-Expression resultierte (s. 4.1.4), lediglich 50,2-74,5 % GFP-negative Zellen beobachtet wurden, wurden bei dem Einbau einzelner Mutanten (s. 4.2.1) wie auch bei der *R175-Library* (s. 4.2.2) recht gute Rekombinationseffizienzen mit 73,6-94,1 % GFP-negativer Zellen beobachtet. Obwohl in allen Experimenten die gleiche Anzahl an Zellen zur gleichen Zeit vor der Infektion ausplattiert wurden (200.000 Zellen auf 6-well Platte bzw. $1 \cdot 10^6$ Zellen auf 6 cm-Platte, 18 h vor Infektion), können Schwankungen auch aufgrund von unterschiedlicher Konfluenz zustande gekommen sein. Bei der AdenoCre-Infektion wurde eine sehr hohe MOI von 250 verwendet. In einem weiteren vorigen Experiment wurden MOI von 100, 250, 500 und 1000 in H460-Zellen^{LSL} miteinander verglichen (Daten nicht gezeigt). Nach einer sprunghaften Erhöhung der Rekombinationseffizienz von MOI100 auf MOI250 (GFP-Negativität nach 14 Tagen: MOI100: 50 %, MOI250: 76 %) zeigte sich darüber hinaus keine weitere signifikante Verbesserung bei MOI-Erhöhung (GFP-Negativität nach 14 Tagen: MOI500: 80 %; MOI1000: 83 %). Es ist deshalb fraglich, ob eine weitere MOI-Erhöhung signifikant bessere Ergebnisse liefern würde. Aufgrund der guten Verträglichkeit der H460-Zellen wäre jedoch eine mehrmalige AdenoCre-Infektion mit MOI250 denkbar. Die Verwendung zusätzlicher Moleküle, wie Poly-L-Lysin zeigte sich in Experimenten mit anderen Gewebearten als effizienzsteigernd und wäre auch hier prinzipiell denkbar (Buo et al. 2016).

Interessanterweise wirkte sich die Erhöhung der MOI jedoch bei keinem der durchgeführten Experimente auf das Überleben der Zellen aus: Alle getesteten MOIs wurden stets sehr gut von H460-Zellen getragen, es sind kaum Zellen während dieser Zeit gestorben. Das steht im Kontrast zu den ebenfalls verwendeten HCT116-Zellen, die bereits bei MOI von >25 vermehrt gestresst waren (Daten nicht gezeigt). Als Hypothese dieses Unterschieds zwischen den Zelllinien sei zu nennen, dass Adenoviren bei Menschen vor allem respiratorische Infektionen verursachen (Modrow et al. 2021, S. 629). H460-Zellen, die Lungengewebe abstammen, könnten evolutionsbedingt eine höhere natürliche Barriere gegenüber Adenoviren besitzen als die kolorektalen HCT116-Zellen.

Die erwähnte initiale AdenoCre-Infektion der Zellklone #B4 und #E7, die in Wildtyp-p53-exprimierenden Zellen resultierte, diente der grundsätzlichen Bestätigung zur Funktionalität dieses Systems. Hier ist als Kritikpunkt anzusehen, dass die Rekombination im Vergleich zu den späteren Experimenten nicht ideal war, da die GFP-Negativität 14 Tage nach AdenoCre-Infektion lediglich 50,2 - 74,5 % betrug, was bedeutete, dass nur dieser Anteil der Zellen auch p53 exprimierte. Trotzdem zeigte sich im Western Blot eine deutliche Nutlin-3a-Induzierbarkeit von p53 und zusätzlich eine Induktion von Effektorproteinen p21 und Mdm2 nach AdenoCre-Rekombination (Abbildung 18). Bei weiteren Experimenten mit diesen H460^{Δ/Δ+} Zellen wäre hier die Generierung von Einzelzellklonen sinnvoll. Dies würde in homogen GFP-negativen und p53-exprimierenden Zellen resultieren, was die Ergebnisse optimieren könnte. Zusätzlich ist anzumerken, dass diese Rekombination vor dem Zeitpunkt stattfand, als Puromycin-sensitive Einzelzellklone generiert wurden. Da diese Wildtyp-p53-exprimierenden H460^{Δ/Δ+} Zellen als Kontrolle in den Western Blots und qPCRs verwendet wurden, wäre es hier retrospektiv besser gewesen, erst die Puromycin-sensiblen Zellklone #B4.1 und #E7.6 (und nicht wie hier die Klone #B4 und #E7) durch AdenoCre-Infektion zu rekombinieren. Dies hätte in einer unmittelbareren Wildtyp-Kontrolle resultiert. Da in den Western Blots und qPCRs jedoch lediglich die Induzierbarkeit von p53, p21 und Mdm2 vor und nach AdenoCre-Infektion beobachtet wurde, ist eine große Diskrepanz zwischen #B4 bzw. #E7 und #B4.1 bzw. #E7.6 als Kontrollen eher unwahrscheinlich. Etwaige angesprochene CRISPR/Cas9-induzierte *off-target*-Effekte (Zhang et al. 2015) bei der sgRNA-Transfektion gegen *pac* können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.1.3. Die bekannte Ineffizienz von CRISPR/Cas9 und HDR bei Einbau großer Donor-DNA-Sequenzen zeigt sich auch in diesem Projekt

Eine Problematik der CRISPR/Cas9 und HDR Methodik ist die Ineffizienz dieses Systems (Ma et al. 2017). Diese zeigte sich bei dem ersten Einbau der ca. 4600 bp-langen LSL-Kassette, der sich schwierig gestaltete. Die Zellen wurden nach dieser Transfektion zunächst mit Nutlin-3a selektioniert, wodurch nur *TP53-Knockout*-Zellen – egal ob mit oder ohne LSL-Kassette – überlebten. Diese vorselektionierten Zellen wurden dann per PCR gescreent. Es zeigten sich hier von 95 Einzelzellklonen nur 9 als geeignet für weitere Experimente (9,5 %). Später zeigten diese 9 Einzelzellklone alle das gleiche *Indel*-Muster der beiden *Knockout*-Allele, sodass hier die Annahme besteht, dass alle diese

Einzelzellklone auf derselben Ursprungszelle beruhen. Dies hatte zwar keinen Einfluss auf das weitere Vorgehen, zeigt aber indirekt einmal mehr die Ineffizienz dieses Verfahrens, da somit effektiv nur eine Ursprungszelle die Kombination aus korrektem Einbau der LSL-Kassette und *TP53-Knockout* zeigt. Die tatsächliche Editierungseffizienz nach Transfektion könnte jedoch zu den hier berechneten Werten etwas abweichen, da die Analysen erst nach einer doppelten Selektion mit Puromycin und Nutlin-3a durchgeführt wurden. Somit wurden Zellen, bei denen keine erfolgreiche HDR oder NHEJ erfolgt war, bereits nicht mehr in der Rechnung miteinbezogen, sodass die tatsächliche Editierungseffizienz nach Transfektion wohl niedriger war. Gleichzeitig wurden auch Zellen, die zwar die LSL-Kassette erfolgreich eingebaut hatten, jedoch noch ein aktives *TP53*-Allel hatten, ebenfalls nicht mehr betrachtet, da diese die Nutlin-3a-Selektion nicht überlebt hatten.

Diese geringe HDR-Effizienz von CRISPR/Cas9 ist schon länger bekannt und die Verbesserung von dieser ist Gegenstand intensiver Forschung (Ma et al. 2017; Sander und Joung 2014). Da an der NHEJ und HDR zum Teil verschiedene Enzyme beteiligt sind, konnte durch Hemmung der NHEJ (Maruyama et al. 2015) oder Stimulation der HDR (Song et al. 2016) die HDR-Effizienz durch CRISPR/Cas9 verbessert werden. Andere Studien legten außerdem nahe, dass die geringe HDR-Effizienz vor allem an der niedrigen Konzentration der Donor-DNA an der Stelle des induzierten Doppelstrangbruchs liegen könnte (Ling et al. 2020). So konnte die HDR-Effizienz gesteigert werden, indem die Donor-DNA, in diesem Fall einzelsträngig vorliegend, fest an Cas9 gebunden war und dadurch direkt zur gewünschten Lokalisation geführt wurde (Aird et al. 2018; Ma et al. 2017; Ling et al. 2020). Die Anwendung der letzteren Methodik würde jedoch für die hier gezeigten Experimente einen erheblichen Mehraufwand bedeuten. Gerade für große Donor-DNA-Sequenzen >1000 bp, wie zum Beispiel die hier verwendete Donor-DNA mit LSL-Kassette und zwei Homologie-Armen mit insgesamt ~ 4600 bp, zeigt sich eine größere Herausforderung, effizientes HDR zu erreichen (Ma et al. 2017). Eine Alternative wäre *Prime Editing*, eine Fusion aus Cas9-Nickase und modifizierter Reverser Transkriptase, die, zusammen mit bestimmten *Prime Editing*-RNAs, eine spezifische Genomeditierung erlaubt (Anzalone et al. 2019). Durch weitere Modifizierungen dieser Methode sind auch Insertionen großer DNA-Fragmente von mehreren Kilobasen möglich (Ioannidi et al. 2021).

Insgesamt zeigten sich in dieser Arbeit jedoch diejenigen Zellen, die die Selektion nach Transfektion überlebt hatten, häufig als effizient editiert und gerade die davon generierten

Einzelzellklone konnten meist problemlos in Experimenten verwendet werden. Dennoch wurde bei der Selektion oft eine sehr hohe Sterberate der Zellen beobachtet, sodass der anschließend resultierende polyklonale Zellpool zum Teil aus nur wenigen überlebenden Zellen bestand.

Alle hier gezeigten Transfektionen wurden unter Hinzugabe von Lipofectamine® 2000 durchgeführt. Eine Steigerung der Editierungseffizienz nach Transfektion durch höhere oder niedrigere Konzentrationen von Lipofectamine® 2000, die Verwendung von Calciumchlorid (CaCl₂), β-Arrest-IN oder FuGENE® HD konnte nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Weitere Methoden zur Transfektion von Zellen, wie die Verwendung von Lipofectamine® 3000 oder die Elektroporation könnten hier jedoch zu einer Steigerung der Editierungseffizienz nach Transfektion führen. Ersteres ist ein verbessertes Molekül mit höherer Effizienz verglichen mit Lipofectamine® 2000 (ThermoFisher Scientific). Die Elektroporation basiert auf der Tatsache, dass sich durch Anlegen einer hohen Spannung kurzzeitig Poren in der Membran der Zelle bilden, durch die Makromoleküle passieren können (Potter 2003).

Ein weiterer Faktor, der die Editierungseffizienz nach Transfektionen reduzieren könnte, ist die durch den Doppelstrangbruch induzierte Aktivierung von *Mismatch*-Reparatur-Genen, ein wichtiger Vertreter von ihnen ist MLH1 (Spies und Fishel 2015). In vorigen Studien konnte gezeigt werden, dass die HDR-Effizienz in MLH1-defizienten Zellen höher ist als in Zellen mit aktiver MLH1-Expression (Spell und Jinks-Robertson 2003). So könnte die Editierungseffizienz erhöht werden, indem MLH1 inhibiert wird, z.B. durch die Ko-Transfektion eines dominant-negativen MLH1 (Chen et al. 2021).

Auch der spätere *Knockout* von *pac* in der LSL-Kassette zeigte sich als recht ineffizient, obwohl hier unter Induktion von NHEJ statt HDR eine höhere Effizienz erwartet worden wäre. Nach Transfektion einer sgRNA, die zusammen mit der Cas9 *Indels* im Rahmen von NHEJ des Puromycin-Resistenz Gens induzieren sollte, konnten auf dem 96-well-Format zunächst 18 der 96 generierten Einzelzellklone als Puromycin-sensibel identifiziert werden. Nach wiederholtem Testen zeigten sich lediglich 2 dieser Einzelzellklone als vollständig Puromycin-sensitiv (2,1 %). Dies schien bei Observation der Zellen in der Zellkultur jedoch weniger ein Problem des NHEJ selbst zu sein als eher ein Problem des Vektors. Die Zellen schienen diesen nicht gut zu tolerieren, wodurch viele Zellen bereits nach Transfektion, jedoch vor der Selektion starben. Dies könnte etwa an einer schlechten DNA-Qualität dieses Vektors liegen, was weiterer Nachforschung bedarf. Viele Zellen starben anschließend nach der Selektion mit Hygromycin B. Eine

Optimierung der Hygromycin-Konzentration könnte die Ausbeute möglicherweise verbessern.

5.1.4. Die Mutagenese des R175-Lokus der generierten Zelllinie ist erfolgreich, bietet jedoch Potenzial zur Optimierung

Der anschließende Einbau einzelner Mutanten war ebenfalls nicht vollständig effizient. Durchschnittlich konnte bei Sequenzierung der cDNA etwa in jedem dritten Einzelzellklon der erfolgreiche Einbau und somit die Expression der Mutation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb war es sinnvoll und auch notwendig, dass nach jedem experimentellen Transfektions- oder Infektionsschritt zunächst Einzelzellklone generiert wurden, die dann über Sanger-Sequenzierung, PCR, Molekül-Resistenzen oder FACS-Analyse direkt in ihrer genotypischen Richtigkeit validiert werden konnten. Bei Charakterisierung einzelner Mutanten kostete dies zwar zusätzliche Zeit, was aber durch deutlich bessere Ergebnisse und höhere Nachvollziehbarkeit überwogen wurde. Durch engmaschige Kontrollen zeigten in dieser Arbeit die mutationstragenden Einzelzellklone im Western Blot und in der RT-qPCR die erwarteten Ergebnisse.

Nach saturierter Mutagenese durch Transfektion von *Libraries* können keine Einzelzellklone generiert werden, die einzeln auf den erfolgreichen Einbau einer Mutation überprüft werden können. Obwohl die Editierungseffizienz auch nach Selektion nicht perfekt ist, ist dies auch nicht nötig, wenn man eine Zellzahl verwendet, die hoch genug ist, um eine rechnerisch ausreichende Abdeckung jeder Mutante zu erhalten, auch wenn einige Zellen keine mutierte Sequenz tragen. So wurden in diesem Fall der R175-*Library*-Transfektion $4 \cdot 10^6$ Zellen ausgesät für 28 Mutationen (bei optimalen Bedingungen ~ 140.000 Zellen pro Mutante), sodass auch nach Abzug der nicht-mutierten Zellen genügend Zellen die jeweilige Mutante tragen sollten.

Zusätzlich versicherte man sich durch die hohe Zellzahl, dass auch bei der angesprochenen hohen Sterberate der Zellen nach Puromycin-Selektion im Anschluss an die Transfektion genügend Zellen überlebten, um eine ausreichende Abdeckung aller Mutanten zu gewährleisten. Zudem wurden in der späteren bioinformatischen Auswertung des NGS die *Reads* ohne Mutation erkannt und herausgerechnet. In der Auswertung des NGS zeigte sich für den Datensatz der Zellen vor Nutlin-3a-Behandlung ein Mittelwert an *Reads* von ca. 5700 und ein Minimum von 173 *Reads* für die stille

Mutation R175R. Alle drei Replikate zeigten verminderte *Reads* der drei R175R-Mutationen.

Die Ergebnisse des NGS ergab für die R175-*Library* eine *Heatmap* der relativen Fitness Scores (RFS) der einzelnen Mutanten (Abbildung **31**), die den Erwartungen und zuvor erhaltenen Ergebnissen in HCT116-Zellen entsprachen (Klimovich 2021). so in größten Teilen erwartet wurden. Wie bereits erwähnt waren diese Ergebnisse insgesamt zwar nicht ideal, aber es wurde hinreichend gezeigt, dass die Durchführung einer saturierter Mutagenese in dem generierten H460-Zellklon prinzipiell funktioniert.

In der Methodik zeigte sich jedoch hier noch etwas Optimierungsbedarf. Zwar zeigten Replikate vor AdenoCre-Infektion noch hochsignifikante Korrelationen (Abbildung **30 B**) und auch im Vergleich der Replikate miteinander vor und nach AdenoCre-Infektion und DMSO-Behandlung waren die Korrelationen signifikant (Abbildung **30 C**). Jedoch wichen die Replikate nach AdenoCre-Infektion und DMSO-Behandlung recht weit voneinander ab (Suppl. Abbildung **III A**). Hierfür waren jedoch einzelne recht starke Ausreißer-Datenpunkte verantwortlich. Bei einer Gesamtanzahl von 28 Datenpunkten hat ein einzelner Ausreißer einen hohen Einfluss auf die Gesamtkorrelation. Als Ursache können hier verschiedene Aspekte eine Rolle gespielt haben. Die initiale Transfektion und Selektion mit Puromycin hat gut funktioniert, was die angesprochene hohe Replikat-Korrelation vor AdenoCre-Infektion zeigt. Im Rahmen der Infektion mit dem AdenoCre-Virus scheinen sich einige Mutanten in den Replikaten verschieden an- und abgereichert zu haben, was so leider nicht zu antizipieren war. Hypothetisch kann hier der Infektionsstress eine Rolle gespielt haben, eventuell bewirken die hohen MOIs doch nicht-absehbare Veränderungen der Zellen.

Dieser Versuch sollte deshalb in Zukunft wiederholt werden, um bei besserer Replikat-Korrelation die hier gezeigten Ergebnisse zu bestätigen. Zusätzlich dazu können weitere Experimente zur Bestimmung des RFS bei Behandlung mit anderen Medikamenten (zusätzlich zu Nutlin-3a) oder mit Bestrahlung durchgeführt werden. Dies kann dann ein weiteres, umfassenderes Gesamtbild geben, wie sich spezifische Mutanten unter unterschiedlichen Therapiebedingungen verhalten.

Die Editierungseffizienz der Mutagenese sowohl einzelner Mutanten als auch der saturierten Mutagenese ist hier sehr schwer festzustellen. Wie erwähnt, trug nach Selektion etwa jeder dritte Einzelzellklon die Mutation, was auf eine recht hohe Editierungseffizienz schließen lassen kann. Diese Ergebnisse beruhen jedoch auf einer kleinen Stichprobengröße ($n=3$ pro Mutation). Bei der R175-*Library* ist die Einschätzung

noch schwieriger, da erst nach einer geschachtelten PCR des polyklonalen Zellpools eine Analyse erfolgte. Insgesamt kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Effizienz bei der *R175-Library* ähnlich zu der der einzelnen Mutanten ist, da hier ein Vektor mit identischer Größe, zusammen mit der gleichen sgRNA transfiziert wurde. Andere Veröffentlichungen zu einer saturierten Mutagenese durch CRISPR/Cas9 und HDR zeigten beim Austausch einzelner Codons eine Effizienz von ca. 3 %, wobei deutlich kürzere Donor-Vektoren verwendet wurden, gleichzeitig jedoch nicht selektioniert werden konnte wie in dieser Arbeit (Findlay et al. 2014).

Die hier durchgeführten Experimente an einer Lungenkrebs-Zelllinie wurden in der AG Stiewe von M. Klimovich und J. Funk zudem an der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 durchgeführt (Klimovich 2021). Beide Datensätze zusammen betrachtet können zeigen, inwiefern das Verhalten einzelner Mutanten in verschiedenen Geweben vergleichbar ist, wodurch gewebespezifische Unterschiede offengelegt werden können. Im Vergleich zu HCT116-Zellen haben die hier verwendeten H460-Zellen den Vorteil, dass sie Zellkulturmethoden, wie die AdenoCre-Infektion deutlich besser und ungestresster überlebten. Zudem konnte in H460-Zellen eine deutliche Stabilisierung von mutiertem p53 festgestellt werden, also eine deutlich höhere intrazelluläre Konzentration von mut-p53 auch ohne Nutlin-3a-Induktion, was so bei HCT116-Zellen nicht beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Nachteilig ist bei den H460-Zellen anzusehen, dass - verglichen mit HCT116-Zellen - die Transfektion vor allem großer Vektoren ineffizienter ist. Dies führte zu der angesprochenen hohen Sterberate bei initialer Selektion nach Transfektion.

Zusammengefasst wurde hier erfolgreich eine Methodik etabliert, bei der durch CRISPR/Cas9 und HDR Mutationen in das *TP53*-Gen eingebaut werden können. Die entstehenden Zellen exprimieren mut-p53 auf physiologischem Level und können zukünftig dazu dienen, das Verhalten spezifischer Mutanten bezüglich der Zellproliferation-Regulierung oder der Chemotherapie-Resistenz zu analysieren.

5.2. Die Mutagenese von *TP53* Exon 8 durch *Base Editing* in H460 und HCT116-Zellen zeigt sehr hohe Effizienz

5.2.1. Für die Mutagenese des R273-Codons wird eine hohe Spezifität und Vorhersehbarkeit beobachtet

Der *Base Editor* zeigte in Experimenten anderer Forschungsgruppen (Wang et al. 2019; Wang et al. 2018), wie auch in Rahmen dieser Arbeit bei den generierten H460- und HCT116-Zellen eine hohe Effizienz. Bei dem initialen Experiment einer einzelnen sgRNA gegen das R273-Codon zeigte sich die erwünschte R273C-*hotspot*-Mutation (Bouaoun et al. 2016) bereits sehr homogen in den Nutlin-3a-selektierten polyklonalen Zellpools (Abbildung 34 B). In den polyklonalen HCT116-Zellen nach *Base Editor* Transfektion zeigten sich bereits in den mit DMSO behandelten Kontrollen viele Zellen editiert, was in der Sanger-Sequenzierung in einem gemischten Peak resultierte (Abbildung 34 B). Folglich war auch die R273C-Mutante in 13/14 der generierten, Nutlin-selektierten Einzelzellklone nachweisbar (Suppl. Abbildung IV), was einer Basensubstitutions-Effizienz an der gewünschten Stelle nach Nutlin-3a-Selektion von 92,86 % entspricht. Ein Einzelzellklon zeigte eine andere Mutation, die jedoch auch auf eine C zu T Basensubstitution zurückzuführen ist (E271K, Daten nicht gezeigt). Diese induzierte Baseneditierung ist an Stelle -3 der verwendeten sgRNA und somit 6 bp außerhalb des Editing-Fensters. Dies ist auf das beim *Base Editor* bereits beschriebene *Bystander Editing* zurückzuführen, bei dem unerwünschte Editierungen in der Nähe der Zielsequenz auftreten (Rees und Liu 2018). Retrospektiv wäre hier noch eine Sanger-Sequenzierung von Einzelzellklonen vor Nutlin-3a-Selektion interessant, um dort die Editierungseffizienz auswerten zu können.

Bei Mutationen der DNA-bindenden-Domäne, die mit einer *loss-of-function* einhergehen, wie z.B. R273C, konnte oftmals eine Stabilisierung dieser Mutante in der Tumorzelle beobachtet werden (Freed-Pastor und Prives 2012). Das hat zum einen die Ursache, dass diese Mutante in der Aktivierung physiologischer Effektorproteine eingeschränkt ist (Frum und Grossman 2014). So kann auch die Aktivierung von Mdm2 im Rahmen des negativen Feedback-Regelkreises gestört sein, wodurch mut-p53 akkumuliert (Li et al. 2011). Zum anderen kann solch eine *loss-of-function* Mutation dazu führen, dass entstandene DNA-Schäden nicht repariert werden, da mut-p53 keine Signalwege einleitet, wodurch p53 ständig weiter aktiviert wird (Frum et al. 2016). Darüber hinaus wird - wie bereits erwähnt - mut-p53 durch Proteine wie etwa HSP90 aktiv stabilisiert,

wodurch unter anderem *gain-of-function*-Effekte ermöglicht werden (Schulz-Heddergott und Moll 2018). Diese Beobachtung konnte vor allem bei den H460-Zellen mit R273C-Mutation festgestellt werden, die verglichen mit der unbehandelten WT-p53 Kontrolle deutlich höhere p53-Level zeigten. Leider konnte in den HCT116^{Δ+} R273C-Zellen keine Stabilisierung in diesem Umfang gezeigt werden. Hier schien im Western Blot die Menge von mutiertem p53 ähnlich zu WT-p53 in der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 36).

In den H460 R273C-Zellen wurde eine etwas niedrigere p53-Bande im Western Blot im Vergleich zu den H460-WT-Zellen observiert, per siRNA-*Knockdown* konnte jedoch die p53-Spezifität dieser Bande bestätigt werden (Abbildung 36, Suppl. Abbildung V). Ein Erklärungsansatz kann sein, dass die R273C Mutation unter anderem mit strukturellen Veränderungen der Sekundärstruktur einhergeht (Olotu und Soliman 2019). *In silico* Experimente konnten für die R273C-Mutante verglichen mit WT-p53 eine veränderte Bandenhöhe im Western Blot zeigen (Garg et al. 2020), die z.B. durch eine Veränderung der Ladungseigenschaften zustande kommen könnten. Zudem unterliegt p53 zahlreichen posttranslationalen Veränderungen (*posttranslational modification*, PTM), wie z.B. die bereits erwähnte Phosphorylierung und Acetylierung zur Stabilisierung, als auch die Polyubiquitinierung als Markierung zur Degradierung (Bode und Dong 2004). Diese PTMs zur Regulation von p53 sind viehzählig und treten oft in Kombination miteinander auf (Liu et al. 2019). Sie können sich je nach Gewebetyp und äußerlichen Stressfaktoren ändern (Meek und Anderson 2009), was ebenfalls zu der veränderten p53-Bandenhöhe beitragen könnte. Die Überprüfung dieser Hypothesen obliegt jedoch zukünftigen Experimenten.

Es wurde gezeigt, dass die Akkumulation von mutiertem p53 nicht nur von der Mutation selbst abhängt, sondern vor allem auch von der Regulation und dem Expressionslevel von Mdm2 (Terzian et al. 2008; Koga et al. 2001). HCT116-Zellen exprimieren kein p14^{ARF} (Burri et al. 2001), das physiologisch die Zellproliferation inhibiert, indem es die p53-Degradierung durch Mdm2 blockiert und darüber zu einer Stabilisierung von p53 führt (Pomerantz et al. 1998). Die aus dem Mangel an p14^{ARF} resultierende höhere Mdm2-Aktivität könnte eine Ursache für die geringere Akkumulation von mutiertem p53 sein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch das zelluläre Umfeld die Stabilisierung von mutiertem p53 beeinflusst, da normale Zellen mit mutiertem p53 keine Stabilisierung von Letzterem zeigen (Terzian et al. 2008). Auch dieses zelluläre Umfeld könnte sich zwischen HCT116 und H460-Zellen unterscheiden. Eine weitere Annahme könnte sein,

dass die beiden Zelllinien nach der Mutagenese eine unterschiedlich lange Zeit zur Anpassung benötigen, um die Stabilisierung von mut-p53 adäquat umsetzen zu können. Obwohl HCT116- und H460-Zellen beide Tumoren mit WT-p53 entstammen und lediglich durch den *Base Editor* eine *hotspot*-Mutation eingefügt wurde, scheinen darüber hinaus erhebliche gewebespezifische Diskrepanzen zu bestehen. Dies untermauert erneut die Notwendigkeit, Experimente in Zellen mehrerer Gewebe durchzuführen und diese Ergebnisse anschließend zu vergleichen.

5.2.2. Die Analyse des Editierungsmusters des Base Editors gibt Einblicke in Präferenzen der benachbarten Nukleotide des zu editierenden Cytosins

Auch in der Mutagenese von *TP53* Exon 8 mit 26 unterschiedlichen sgRNAs wurde eine sehr hohe C zu T Transitionseffizienz beobachtet. Alle durch Sanger-Sequenzierung observierten Mutationen zeigten einen sehr homogenen Peak der substituierten Base(n) nach Nutlin-3a-Selektion. Leider war das Muster, welche sgRNA welche Basensubstitution hervorruft, kaum vorhersehbar. Zwar sind alle beobachteten Mutationen auf eine C zu T-Editierung zurückzuführen. Jedoch zeigten sich auch in 11/27 (40,7 %) aller Fälle Substituierungen außerhalb des definierten *Base Editing*-Fensters von Base 3-8 der sgRNA aus 5'-Richtung (Wang et al. 2018). Wie bereits in 4.3.2 erwähnt, befanden sich 93 % (25/27) der beobachteten Mutationen in dem Editierungsfenster von Base 1-12 der sgRNA. Dies korreliert eher mit dem zu erwartenden Editierungsmuster der verwendeten hA3A vor deren Punktmutation Y130F, die ein erweitertes Fenster von Base 2-13 der sgRNA aus 5'-Richtung zeigt (Wang et al. 2018).

Es blieben jedoch auch einige Cytosin-Basen innerhalb des Editierungsfensters uneditiert. In dem Editierungsfenster von Base 3-8 waren insgesamt 16/23 Cytosin-Basen editiert (69,6 %), bei Betrachtung des Fensters von Base 1-12 waren 25/54 aller Cytosin-Nukleotide editiert (46,3 %). Dies lässt vermuten, dass innerhalb des verengten Editierungsfensters von Base 3-8 nach Y130F-Mutation der hA3A eine deutlich effizientere Basentransition durch Desaminierung stattfand, jedoch weiterhin Restaktivität in einem ausgeweiteten Bereich des Editierungsfensters, etwa von Base 1-12 der sgRNA aus 5'-Richtung bestand.

Cytosin-Basen der DNA können durch DNA-Methyltransferasen zu 5-Methylcytosin methyliert werden (Abbildung **10 B**) (Rassow et al. 2016, S. 466–467). Diese ist essenziell für die normale Entwicklung von Organismen und die Funktion von Zellen (Robertson 2005). Methyliertes Cytosin tritt bevorzugt an CpG-Sequenzen auf, insgesamt sind 70-80 % aller Cytosin-Basen von CpG-Dinukleotiden methyliert (Bird 2002). Methylcytosin kann die Bindung von Proteinen an die DNA stören, dies kann in Promoterregionen z.B. zu einer Gen-Repression führen, weshalb in vielen aktiven Promoterregionen unmethylierte CpG-Sequenzen zu finden sind (Jin et al. 2011). Jedoch ist auch die Bindung und Aktivität von den meisten Deaminasen der AID/APOBEC-Familie in diesem Kontext gestört und vermindert (Nabel et al. 2012).

In einem Vergleich verschiedener Deaminasen zeigt lediglich die auch in dieser Arbeit verwendete hA3A eine effiziente Editierung von methyliertem Cytosin (Wang et al. 2018). Deshalb wurde auch in dieser Arbeit die Effizienz des *Base Editors* an CpG-Dinukleotiden untersucht. Insgesamt wurden in dem designierten Editierungsfenster von Base 1-12 der sgRNA aus 5'-Richtung 11 Cytosin-Basen in CpG-Sequenzen gefunden, von denen 10 editiert worden waren (90,9 %). Somit zeigte sich hier sogar eine Bevorzugung der Editierung von Cytosin-Basen in CpG-Dinukleotiden verglichen mit nicht-methylierten Cytosin-Basen (10/11 CpG vs. 15/43 nicht-CpG). Diese 11 CpG-Sequenzen liegen zwischen Base 2-11 des Editierungsfensters, sodass nicht von einem zufälligen Auftreten von CpG-Dinukleotiden innerhalb des effizienteren Editierungsfensters ausgegangen werden kann. Ein Erklärungsansatz für die effiziente Editierung kann sein, dass die Thymin-Base, die durch Desaminierung von Methylcytosin entsteht, schwieriger durch Reparaturenzyme erkannt werden kann als entstehendes Uracil nach der Desaminierung von nicht-methyliertem Cytosin. Als Limitation ist hier anzuführen, dass nicht alle Cytosin-Basen an CpG-Sequenzen in methylierter Form vorliegen und somit nicht sicher davon ausgegangen werden konnte, dass die hier beobachteten Cytosin-Basen methyliert vorlagen. Zudem war die Stichprobengröße recht klein.

Die Lokalisation der hier untersuchten Sequenzen außerhalb einer Promotorsequenz zusammen mit der Tatsache, dass ein Großteil aller solcher Cytosine an CpG-Sequenzen methyliert sind, macht es wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil dieser hier analysierten Cytosin-Basen tatsächlich methyliert sind (Bird 2002; Jin et al. 2011). Diese hier beobachtete effiziente Editierung von Cytosin an CpG-Sequenzen wurde in dieser Form nicht erwartet, da in vorigen Veröffentlichungen Editierungseffizienzen methylierten

Cytosins von rund 35 % observiert worden waren (Wang et al. 2018). Über ein Screening von weitaus mehr Mutationen als hier sollte deshalb eruiert werden, ob sich diese Beobachtung als Zufall herausstellt oder ob, etwa gewebeabhängig oder sgRNA-abhängig, Cytosin-Nukleotide in CpG-Sequenzen bevorzugt werden.

Bei Beobachtung weiterer Basen nach einem Cytosin in einem Editierungsfenster fiel ein deutlicher Trend der Ineffizienz für Thymin (CpT) oder Cytosin (CpC) auf. Hier waren nur 38,5 % (10/26) bzw. 26,3 % (5/19) aller Cytosin-Basen editiert, auf die ein Thymin bzw. ein weiteres Cytosin folgte (Abbildung 41). Dies ist im Einklang mit vorigen Veröffentlichungen, die eine Präferenz von hA3A für CpA und CpG zeigten (Logue et al. 2014; Chen et al. 2006).

Bei Betrachtung der Basen, die vor einem Cytosin in einem Editierungsfenster vorkamen, zeigten sich Thymin-Basen vor dem Cytosin (TpC) als Lokalisierungen mit der höchsten Editierungseffizienz (10/15 TpC editiert, 66,7 %), wohingegen ein Cytosin vor einem weiteren Cytosin (CpC) recht ineffizient editiert wurde (6/18, 33,3 %) (Abbildung 41). Auch hier beruhen diese beobachteten Trends nur auf einer kleinen Gesamtanzahl an Proben, weshalb diese in weiteren Experimenten validiert werden sollten. Diese Beobachtungen stimmen nur in Teilen mit anderen Veröffentlichungen überein. Bei der Analyse der Kristallstruktur von hA3A zeigte sich eine deutliche Präferenz für die Editierung von Cytosin-Basen mit einer 5'-Pyrimidin-Base, wobei Thymin (TpC) über Cytosin (CpC) präferiert wird (Kouno et al. 2017). Dieses Thymin an Stelle -1 hilft bei einer stabilen Bindung von hA3A, weshalb TpC-Dinukleotide bevorzugt editiert werden (Shi et al. 2017), was auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Dennoch konnte für CpC entgegen den Erwartungen keine Präferenz festgestellt werden. Dies könnte unter anderem mit der hier verwendeten Punktmutation von Tyr130 (Y130F) begründet werden, die an der Bindung der DNA beteiligt ist und in vorigen Veröffentlichungen zu einer Veränderung der Editierungs-Präferenz von hA3A führte (Gehrke et al. 2018). Insgesamt stellte sich so das präferierte Muster von TCA bzw. TCG für hA3A heraus (Chen et al. 2006; Logue et al. 2014; Gehrke et al. 2018). In den hier durchgeführten Experimenten traten jedoch nur 3 TCG-Sequenzen und keine TCA-Sequenz im Editierungsfenster von Base 1-12 der sgRNA auf. Zwar waren 3/3 TCG-Sequenzen editiert, diese Präferenz sollte jedoch in einem repräsentativen Experiment validiert werden.

Eine große Begrenzung darin, mithilfe des hier verwendeten *Base Editors* an flexibel festgelegten Stellen des Genoms Basentransitionen zu induzieren, liegt in der

Notwendigkeit des Vorliegens einer PAM mit der Sequenz „5'-NGG-3'“ bei der SpCas9-Nuklease (Jinek et al. 2012; Jiang et al. 2013). Kürzliche Veröffentlichungen konnten durch spezifische Modifikationen der Cas9-Nuklease eine effiziente Baseneditierung auch mit den PAM-Sequenzen „NG“ und „NRN“ (R entspricht Base A oder G) bzw. „NYN“ (Y entspricht Base C oder T) erreichen (Walton et al. 2020; Tan et al. 2020). Zudem konnte durch eine Veränderung der *linker*-Sequenz zwischen nCas9 und Deaminase oder durch spezifische Trunkierungen der Deaminase das Editierungsfenster des *Base Editors* deutlich verengt werden, was eine deutlich präzisere Baseneditierung ermöglicht (Tan et al. 2019).

Abschließend wurde hier die Option einer spezifischen und effizienten Genomeditierung mithilfe des *Base Editors* gezeigt. Gleichzeitig sollte das System noch weiter optimiert werden, um eine höhere Prädiktabilität und eine höhere Flexibilität der zu editierenden Base zu erreichen.

6. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend ist der in dieser Arbeit generierte Zellklon H460^{ΔΔ/LSL} *PuroS* #B4.1 dafür geeignet, die hier durchgeführten saturierten Mutagenese-Experimente auch in größerem Rahmen durchführen zu können. So können mit der Zeit über das Exon 5 hinaus für das gesamte *TP53*-Gen Daten generiert werden, die Aufschluss über das Verhalten aller erdenklichen synonymen, nicht-synonymen und *frameshift*-Mutationen von p53 unter verschiedenen Therapiebedingungen geben. Dieser Datensatz geht weit über die Charakterisierung von *hotspot*-Mutanten hinaus und beleuchtet so erstmals auch die Nicht-*hotspot*- sowie Intron-Mutationen.

Eine direkte Anwendung von CRISPR/Cas9 und HDR in Tumoren *in vivo* ist jedoch zum derzeitigen Stand undenkbar. Für eine effiziente Therapie einer dortigen p53-Mutation müsste die HDR-Effizienz weitaus höher sein. Deshalb konnte durch diese Arbeit vielmehr ein Eindruck über das Verhalten einzelner p53-Mutanten *in vitro* erlangt werden. Diese Erkenntnisse können dann auf *in vivo*-Experimente und später auch den Menschen selbst angewendet werden. Daraus entsteht langfristig die Möglichkeit, bestehende konventionelle Therapieverfahren in der Onkologie individuell angepasst an die jeweilige Mutante optimieren zu können. Durch gezielte Nutzung von Sensibilitäten einzelner Mutanten gegen bestimmte Therapien könnte so die Prognose von p53-mutierten Krebspatienten verbessert werden. Denn obwohl p53 das am meisten beforschte Protein der Welt ist und über 50 % aller Krebspatienten mutiertes p53 tragen, gibt es immer noch keine zugelassenen Medikamente dagegen (Bouaoun et al. 2016; Zhu et al. 2020). Oftmals ändert der p53-Status von Patient:innen nichts am Therapieschema, obwohl gezeigt werden konnte, dass in verschiedenen Krebsarten eine p53-Mutation zu einer Verschlechterung der Prognose führt (Ahrendt et al. 2003; Wang et al. 2017). Eine umfassende funktionelle Charakterisierung einzelner Mutanten könnte ein weiterer wichtiger Schritt in der Behandlung von Patientinnen und Patienten mit p53-mutierten Tumoren sein.

Der *Base Editor*, bestehend aus der nCas9, fusioniert mit der Desaminase hA3A (Y130F), war zwar sehr effizient, jedoch in der Anwendung zur spezifischen Mutagenese einzelner Codons eher ungeeignet. Die Unvorhersehbarkeit der induzierten Basensubstitutionen zusammen mit der begrenzten Anzahl an PAM-Sequenzen erschwerten dies. Zwar konnten hier zwei *hotspot*-Mutationen, R273C und R282W, effizient generiert werden, jedoch ist für eine gezielte Mutagenese die vorherige Testung unterschiedlicher sgRNAs

notwendig. Leider konnte deshalb nicht von dem reinen Vorliegen des *hotspot*-Codons in dem *Base Editing*-Fenster auf die tatsächliche Basensubstitution von diesem durch den *Base Editor* geschlossen werden. Eine Anwendung des *Base Editors* für eine gezielte saturierte Mutagenese wie durch CRISPR/Cas9 und HDR ist aus diesen Gründen nicht sinnvoll.

Eine Möglichkeit, den *Base Editor* für saturierte Mutagenese-Experimente geeigneter zu machen, kann darin bestehen, die Restriktion durch die PAM aufzuheben, indem der *Base Editor* beinahe ohne PAM gezielte Editierungen im Genom vornehmen kann (Walton et al. 2020). Dies in Kombination mit kürzlichen Entwicklungen, das Editierungsfenster des *Base Editors* weiter zu verengen macht eine gezielte und gleichwohl flexible Genomeditierung denkbar (Tan et al. 2019).

Die therapeutische Anwendung dieses neuen *Base Editor*-Systems ist eine derzeitige Hoffnung der modernen Medizin (Porto et al. 2020). C zu T Transitionen sind die häufigste Art nicht-synonymer Mutationen in Tumoren generell (García-Nieto et al. 2019) und in *TP53* (Bouaoun et al. 2016). Zudem sind über die Hälfte aller vererblichen Erkrankungen auf den Austausch einzelner Nukleotide zurückzuführen (Sun und Yu 2019).

Die Möglichkeit einer präzisen Charakterisierung von p53-Mutanten ist ein wichtiger Schritt hin zu einer optimalen individuellen Behandlung jeden Tumors mit mutiertem p53.

7. Literaturverzeichnis

Ahrendt, Steven A.; Hu, Yingchuan; Buta, Martin; McDermott, Michael P.; Benoit, Nicole; Yang, Stephen C. et al. (2003): p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. In: *Journal of the National Cancer Institute* 95 (13), S. 961–970. DOI: 10.1093/jnci/95.13.961.

Aird, Eric J.; Lovendahl, Klaus N.; St Martin, Amber; Harris, Reuben S.; Gordon, Wendy R. (2018): Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. In: *Communications biology* 1, S. 54. DOI: 10.1038/s42003-018-0054-2.

American Cancer Society (2020): The Cancer Atlas. Unter Mitarbeit von W. H.O. (IARC). Online verfügbar unter <https://canceratlas.cancer.org/>, zuletzt geprüft am 10.04.2021.

Anton, M.; Graham, F. L. (1995): Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. In: *Journal of virology* 69 (8), S. 4600–4606. DOI: 10.1128/jvi.69.8.4600-4606.1995.

Antonia, Scott J.; Villegas, Augusto; Daniel, Davey; Vicente, David; Murakami, Shuji; Hui, Rina et al. (2017): Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *The New England journal of medicine* 377 (20), S. 1919–1929. DOI: 10.1056/NEJMoa1709937.

Anzalone, Andrew V.; Randolph, Peyton B.; Davis, Jessie R.; Sousa, Alexander A.; Koblan, Luke W.; Levy, Jonathan M. et al. (2019): Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. In: *Nature* 576 (7785), S. 149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.

Appella, E.; Anderson, C. W. (2001): Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. In: *European journal of biochemistry* 268 (10), S. 2764–2772. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2001.02225.x.

Arriagada, Rodrigo; Bergman, Bengt; Dunant, Ariane; Le Chevalier, Thierry; Pignon, Jean-Pierre; Vansteenkiste, Johan (2004): Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. In: *The New England journal of medicine* 350 (4), S. 351–360. DOI: 10.1056/NEJMoa031644.

Baker, S. J.; Fearon, E. R.; Nigro, J. M.; Hamilton, S. R.; Preisinger, A. C.; Jessup, J. M. et al. (1989): Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. In: *Science (New York, N.Y.)* 244 (4901), S. 217–221. DOI: 10.1126/science.2649981.

Banin, S.; Moyal, L.; Shieh, S.; Taya, Y.; Anderson, C. W.; Chessa, L. et al. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5383), S. 1674–1677. DOI: 10.1126/science.281.5383.1674.

Barrangou, Rodolphe; Fremaux, Christophe; Deveau, H el ene; Richards, Melissa; Boyaval, Patrick; Moineau, Sylvain et al. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. In: *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819), S. 1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140.

- Bartek, Jiri; Lukas, Jiri (2003): Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. In: *Cancer cell* 3 (5), S. 421–429. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00110-7.
- Baten, A. K. M. A.; Chang, B. C. H.; Halgamuge, S. K.; Li, Jason (2006): Splice site identification using probabilistic parameters and SVM classification. In: *BMC bioinformatics* 7 Suppl 5, S15. DOI: 10.1186/1471-2105-7-S5-S15.
- Bieging, Kathryn T.; Mello, Stephano Spano; Attardi, Laura D. (2014): Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. In: *Nature reviews. Cancer* 14 (5), S. 359–370. DOI: 10.1038/nrc3711.
- Bikard, David; Jiang, Wenyan; Samai, Poulami; Hochschild, Ann; Zhang, Feng; Marraffini, Luciano A. (2013): Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. In: *Nucleic acids research* 41 (15), S. 7429–7437. DOI: 10.1093/nar/gkt520.
- Bird, Adrian (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. In: *Genes & development* 16 (1), S. 6–21. DOI: 10.1101/gad.947102.
- Bode, Ann M.; Dong, Zigang (2004): Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. In: *Nature reviews. Cancer* 4 (10), S. 793–805. DOI: 10.1038/nrc1455.
- Boettcher, Steffen; Miller, Peter G.; Sharma, Rohan; McConkey, Marie; Leventhal, Matthew; Krivtsov, Andrei V. et al. (2019): A dominant-negative effect drives selection of TP53 missense mutations in myeloid malignancies. In: *Science (New York, N.Y.)* 365 (6453), S. 599–604. DOI: 10.1126/science.aax3649.
- Bouaoun, Liacine; Sonkin, Dmitriy; Ardin, Maude; Hollstein, Monica; Byrnes, Graham; Zavadil, Jiri; Olivier, Magali (2016): TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. In: *Human mutation* 37 (9), S. 865–876. DOI: 10.1002/humu.23035.
- Bougeard, G.; Sesboüé, R.; Baert-Desurmont, S.; Vasseur, S.; Martin, C.; Tinat, J. et al. (2008): Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. In: *Journal of medical genetics* 45 (8), S. 535–538. DOI: 10.1136/jmg.2008.057570.
- Bowater, Richard; Doherty, Aidan J. (2006): Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. In: *PLoS genetics* 2 (2), e8. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020008.
- Bradford, Marion M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1-2), S. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bullock, A. N.; Fersht, A. R. (2001): Rescuing the function of mutant p53. In: *Nature reviews. Cancer* 1 (1), S. 68–76. DOI: 10.1038/35094077.
- Buo, Atum M.; Williams, Mark S.; Kerr, Jaclyn P.; Stains, Joseph P. (2016): A cost-effective method to enhance adenoviral transduction of primary murine osteoblasts and bone marrow stromal cells. In: *Bone research* 4, S. 16021. DOI: 10.1038/boneres.2016.21.
- Burri, N.; Shaw, P.; Bouzourene, H.; Sordat, I.; Sordat, B.; Gillet, M. et al. (2001): Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon

- cancer. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81 (2), S. 217–229. DOI: 10.1038/labinvest.3780230.
- Bykov, Vladimir J. N.; Eriksson, Sofi E.; Bianchi, Julie; Wiman, Klas G. (2018): Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. In: *Nature reviews. Cancer* 18 (2), S. 89–102. DOI: 10.1038/nrc.2017.109.
- Cahilly-Snyder, L.; Yang-Feng, T.; Francke, U.; George, D. L. (1987): Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. In: *Somatic cell and molecular genetics* 13 (3), S. 235–244. DOI: 10.1007/BF01535205.
- Chacko, Jenu V.; Eliceiri, Kevin W. (2019): Autofluorescence lifetime imaging of cellular metabolism: Sensitivity toward cell density, pH, intracellular, and intercellular heterogeneity. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 95 (1), S. 56–69. DOI: 10.1002/cyto.a.23603.
- Chen, Hui; Lilley, Caroline E.; Yu, Qin; Lee, Darwin V.; Chou, Jody; Narvaiza, Iñigo et al. (2006): APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. In: *Current Biology* 16 (5), S. 480–485. DOI: 10.1016/j.cub.2006.01.031.
- Chen, Peter J.; Hussmann, Jeffrey A.; Yan, Jun; Knipping, Friederike; Ravisankar, Purnima; Chen, Pin-Fang et al. (2021): Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. In: *Cell* 184 (22), 5635–5652.e29. DOI: 10.1016/j.cell.2021.09.018.
- Cheng, Feixiong; Liang, Han; Butte, Atul J.; Eng, Charis; Nussinov, Ruth (2019): Personal Mutanomes Meet Modern Oncology Drug Discovery and Precision Health. In: *Pharmacological reviews* 71 (1), S. 1–19. DOI: 10.1124/pr.118.016253.
- Cho, Seung Woo; Kim, Sojung; Kim, Yongsub; Kweon, Jiyeon; Kim, Heon Seok; Bae, Sangsu; Kim, Jin-Soo (2014): Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. In: *Genome research* 24 (1), S. 132–141. DOI: 10.1101/gr.162339.113.
- Coker, Elizabeth A.; Mitsopoulos, Costas; Tym, Joesph E.; Komianou, Angeliki; Kannas, Christos; Di Micco, Patrizio et al. (2019): canSAR: update to the cancer translational research and drug discovery knowledgebase. In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D917–D922. DOI: 10.1093/nar/gky1129.
- Deltcheva, Elitza; Chylinski, Krzysztof; Sharma, Cynthia M.; Gonzales, Karine; Chao, Yanjie; Pirzada, Zaid A. et al. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. In: *Nature* 471 (7340), S. 602–607. DOI: 10.1038/nature09886.
- Deutsches Krebsforschungszentrum (Hrsg.) (2008): Frauen und Rauchen in Deutschland.
- Dittmer, D.; Pati, S.; Zambetti, G.; Chu, S.; Teresky, A. K.; Moore, M. et al. (1993): Gain of function mutations in p53. In: *Nature genetics* 4 (1), S. 42–46. DOI: 10.1038/ng0593-42.

- Doench, John G.; Fusi, Nicolo; Sullender, Meagan; Hegde, Mudra; Vaimberg, Emma W.; Donovan, Katherine F. et al. (2016): Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. In: *Nature biotechnology* 34 (2), S. 184–191. DOI: 10.1038/nbt.3437.
- Donehower, Lawrence A.; Soussi, Thierry; Korkut, Anil; Liu, Yuexin; Schultz, Andre; Cardenas, Maria et al. (2019): Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. In: *Cell reports* 28 (5), 1370-1384.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.07.001.
- Douillard, Jean-Yves; Rosell, Rafael; Lena, Mario de; Carpagnano, Francesco; Ramlau, Rodryg; González-Larriba, Jose Luis et al. (2006): Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. In: *The Lancet Oncology* 7 (9), S. 719–727. DOI: 10.1016/S1470-2045(06)70804-X.
- Duan, Jinzhi; Lu, Guangqing; Xie, Zhan; Lou, Mingliang; Luo, Jiao; Guo, Lei; Zhang, Yu (2014): Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. In: *Cell research* 24 (8), S. 1009–1012. DOI: 10.1038/cr.2014.87.
- Eberhardt, W.; Stamatis, G.; Stuschke, M.; Wilke, H.; Müller, M. R.; Kolks, S. et al. (1999): Prognostically orientated multimodality treatment including surgery for selected patients of small-cell lung cancer patients stages IB to IIIB: long-term results of a phase II trial. In: *British journal of cancer* 81 (7), S. 1206–1212. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690830.
- El-Deiry, W. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. In: *Cell* 75 (4), S. 817–825. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90500-p.
- Eliyahu, D.; Raz, A.; Gruss, P.; Givol, D.; Oren, M. (1984): Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. In: *Nature* 312 (5995), S. 646–649. DOI: 10.1038/312646a0.
- Engler, Carola; Kandzia, Romy; Marillonnet, Sylvestre (2008): A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. In: *PloS one* 3 (11), e3647. DOI: 10.1371/journal.pone.0003647.
- Featherstone, Carol; Jackson, Stephen P. (1999): DNA double-strand break repair. In: *Current Biology* 9 (20), R759-R761. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)80005-6.
- Fiedler, Stefan; Wirth, Reinhard (1988): Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. In: *Analytical Biochemistry* 170 (1), S. 38–44. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90086-3.
- Findlay, Gregory M.; Boyle, Evan A.; Hause, Ronald J.; Klein, Jason C.; Shendure, Jay (2014): Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. In: *Nature* 513 (7516), S. 120–123. DOI: 10.1038/nature13695.
- Freed-Pastor, William A.; Prives, Carol (2012): Mutant p53: one name, many proteins. In: *Genes & development* 26 (12), S. 1268–1286. DOI: 10.1101/gad.190678.112.

- Frum, Rebecca A.; Grossman, Steven R. (2014): Mechanisms of mutant p53 stabilization in cancer. In: *Sub-cellular biochemistry* 85, S. 187–197. DOI: 10.1007/978-94-017-9211-0_10.
- Frum, Rebecca A.; Love, Ian M.; Damle, Priyadarshan K.; Mukhopadhyay, Nitai D.; Palit Deb, Swati; Deb, Sumitra; Grossman, Steven R. (2016): Constitutive Activation of DNA Damage Checkpoint Signaling Contributes to Mutant p53 Accumulation via Modulation of p53 Ubiquitination. In: *Molecular cancer research : MCR* 14 (5), S. 423–436. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0363.
- Gambardella, Valentina; Tarazona, Noelia; Cejalvo, Juan Miguel; Lombardi, Pasquale; Huerta, Marisol; Roselló, Susana et al. (2020): Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. In: *Cancers* 12 (4). DOI: 10.3390/cancers12041009.
- García-Nieto, Pablo E.; Morrison, Ashby J.; Fraser, Hunter B. (2019): The somatic mutation landscape of the human body. In: *Genome biology* 20 (1), S. 298. DOI: 10.1186/s13059-019-1919-5.
- Garg, Ankush; Hazra, Jagadish Prasad; Sannigrahi, Malay Kumar; Rakshit, Sabyasachi; Sinha, Sharmistha (2020): Variable Mutations at the p53-R273 Oncogenic Hotspot Position Leads to Altered Properties. In: *Biophysical journal* 118 (3), S. 720–728. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.12.015.
- Gartel, Andrei L.; Radhakrishnan, Senthil K. (2005): Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. In: *Cancer research* 65 (10), S. 3980–3985. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3995.
- Gasiunas, Giedrius; Barrangou, Rodolphe; Horvath, Philippe; Siksnys, Virginijus (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39), E2579-86. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.
- Gehrke, Jason M.; Cervantes, Oliver; Clement, M. Kendell; Wu, Yuxuan; Zeng, Jing; Bauer, Daniel E. et al. (2018): An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. In: *Nature biotechnology* 36 (10), S. 977–982. DOI: 10.1038/nbt.4199.
- Greenblatt, M. S.; Bennett, W. P.; Hollstein, M.; Harris, C. C. (1994): Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. In: *Cancer research* 54 (18), S. 4855–4878.
- Grossman, Robert L.; Heath, Allison P.; Ferretti, Vincent; Varmus, Harold E.; Lowy, Douglas R.; Kibbe, Warren A.; Staudt, Louis M. (2016): Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. In: *The New England journal of medicine* 375 (12), S. 1109–1112. DOI: 10.1056/NEJMp1607591.
- Haeussler, Maximilian; Schönig, Kai; Eckert, Hélène; Eschstruth, Alexis; Mianné, Joffrey; Renaud, Jean-Baptiste et al. (2016): Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. In: *Genome biology* 17 (1), S. 148. DOI: 10.1186/s13059-016-1012-2.
- Han, Jing; Farnsworth, Richard L.; Tiwari, Jawahar L.; Tian, Jie; Lee, Hin; Ikonomi, Pranvera et al. (2006): Quality prediction of cell substrate using gene expression profiling. In: *Genomics* 87 (4), S. 552–559. DOI: 10.1016/j.ygeno.2005.11.017.

- Harris, Reuben S.; Petersen-Mahrt, Svend K.; Neuberger, Michael S. (2002): RNA Editing Enzyme APOBEC1 and Some of Its Homologs Can Act as DNA Mutators. In: *Molecular Cell* 10 (5), S. 1247–1253. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00742-6.
- Harris, Sandra L.; Levine, Arnold J. (2005): The p53 pathway: positive and negative feedback loops. In: *Oncogene* 24 (17), S. 2899–2908. DOI: 10.1038/sj.onc.1208615.
- Hashim, D.; Boffetta, P.; La Vecchia, C.; Rota, M.; Bertuccio, P.; Malvezzi, M.; Negri, E. (2016): The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (5), S. 926–933. DOI: 10.1093/annonc/mdw027.
- Hauk, Andrea (2013): Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. In: *Biologie in unserer Zeit* 43 (5), S. 278. DOI: 10.1002/biuz.201390093.
- Haupt, Y.; Maya, R.; Kazaz, A.; Oren, M. (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. In: *Nature* 387 (6630), S. 296–299. DOI: 10.1038/387296a0.
- Herold, Gerd (2021): Innere Medizin 2021: De Gruyter.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. In: *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11 (9), S. 1026–1030. DOI: 10.1038/nbt0993-1026.
- Horvath, Philippe; Barrangou, Rodolphe (2010): CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5962), S. 167–170. DOI: 10.1126/science.1179555.
- Hsiau, Tim; Conant, David; Rossi, Nicholas; Maures, Travis; Waite, Kelsey; Yang, Joyce et al. (2018): Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data.
- Hsu, Patrick D.; Scott, David A.; Weinstein, Joshua A.; Ran, F. Ann; Konermann, Silvana; Agarwala, Vineeta et al. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. In: *Nature biotechnology* 31 (9), S. 827–832. DOI: 10.1038/nbt.2647.
- Huang, Tony P.; Newby, Gregory A.; Liu, David R. (2021): Precision genome editing using cytosine and adenine base editors in mammalian cells. In: *Nature protocols* 16 (2), S. 1089–1128. DOI: 10.1038/s41596-020-00450-9.
- Huertas, Pablo (2010): DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (1), S. 11–16. DOI: 10.1038/nsmb.1710.
- Hulett, H. R.; Bonner, W. A.; Barrett, J.; Herzenberg, L. A. (1969): Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. In: *Science (New York, N.Y.)* 166 (3906), S. 747–749. DOI: 10.1126/science.166.3906.747.
- Ioannidi, Eleonora I.; Yarnall, Matthew T. N.; Schmitt-Ulms, Cian; Krajeski, Rohan N.; Lim, Justin; Villiger, Lukas et al. (2021): Drag-and-drop genome insertion without DNA cleavage with CRISPR-directed integrases.
- Ito, Fumiaki; Fu, Yang; Kao, Shen-Chi A.; Yang, Hanjing; Chen, Xiaojiang S. (2017): Family-Wide Comparative Analysis of Cytidine and Methylcytidine Deamination by Eleven Human APOBEC Proteins. In: *Journal of molecular biology* 429 (12), S. 1787–1799. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.04.021.

- Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie; Center, Melissa M.; Ferlay, Jacques; Ward, Elizabeth; Forman, David (2011): Global cancer statistics. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 61 (2), S. 69–90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- Jiang, Wenyan; Bikard, David; Cox, David; Zhang, Feng; Marraffini, Luciano A. (2013): RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. In: *Nat Biotechnol* 31 (3), S. 233–239. DOI: 10.1038/nbt.2508.
- Jin, Bilian; Li, Yajun; Robertson, Keith D. (2011): DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? In: *Genes & cancer* 2 (6), S. 607–617. DOI: 10.1177/1947601910393957.
- Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Joerger, Andreas C.; Fersht, Alan R. (2016): The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. In: *Annual review of biochemistry* 85, S. 375–404. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014710.
- Jones, S. N.; Roe, A. E.; Donehower, L. A.; Bradley, A. (1995): Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. In: *Nature* 378 (6553), S. 206–208. DOI: 10.1038/378206a0.
- Jore, Matthijs M.; Lundgren, Magnus; van Duijn, Esther; Bultema, Jelle B.; Westra, Edze R.; Waghmare, Sakharam P. et al. (2011): Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. In: *Nature structural & molecular biology* 18 (5), S. 529–536. DOI: 10.1038/nsmb.2019.
- Kakudo, Yuichi; Shibata, Hiroyuki; Otsuka, Kazunori; Kato, Shunsuke; Ishioka, Chikashi (2005): Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. In: *Cancer research* 65 (6), S. 2108–2114. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2935.
- Kandoth, Cyriac; McLellan, Michael D.; Vandin, Fabio; Ye, Kai; Niu, Beifang; Lu, Charles et al. (2013): Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. In: *Nature* 502 (7471), S. 333–339. DOI: 10.1038/nature12634.
- Kato, Shunsuke; Han, Shuang-Yin; Liu, Wen; Otsuka, Kazunori; Shibata, Hiroyuki; Kanamaru, Ryunosuke; Ishioka, Chikashi (2003): Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14), S. 8424–8429. DOI: 10.1073/pnas.1431692100.
- Kim, Hye Joo; Lee, Hyung Joo; Kim, Hyojin; Cho, Seung Woo; Kim, Jin-Soo (2009): Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. In: *Genome research* 19 (7), S. 1279–1288. DOI: 10.1101/gr.089417.108.
- Kim, Kyoungmi; Ryu, Seuk-Min; Kim, Sang-Tae; Baek, Gayoung; Kim, Daesik; Lim, Kayeong et al. (2017): Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos. In: *Nature biotechnology* 35 (5), S. 435–437. DOI: 10.1038/nbt.3816.

- Kitayner, Malka; Rozenberg, Haim; Kessler, Naama; Rabinovich, Dov; Shaulov, Lih; Haran, Tali E.; Shakked, Zippora (2006): Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. In: *Molecular Cell* 22 (6), S. 741–753. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.05.015.
- Kitzman, Jacob O.; Starita, Lea M.; Lo, Russell S.; Fields, Stanley; Shendure, Jay (2015): Massively Parallel Single Amino Acid Mutagenesis. In: *Nature methods* 12 (3), S. 203–206. DOI: 10.1038/nmeth.3223.
- Klimovich, Boris; Merle, Nastasja; Neumann, Michelle; Elmshäuser, Sabrina; Nist, Andrea; Mernberger, Marco et al. (2022): p53 partial loss-of-function mutations sensitize to chemotherapy. In: *Oncogene* 41 (7), S. 1011–1023. DOI: 10.1038/s41388-021-02141-5.
- Klimovich, Mariia (2021): Functional characterization of the TP53 mutome using CRISPR/Cas9 saturating mutagenesis. Inaugural-Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg. Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, zuletzt geprüft am 20.10.2022.
- Kluesner, Mitchell G.; Nedveck, Derek A.; Lahr, Walker S.; Garbe, John R.; Abrahante, Juan E.; Webber, Beau R.; Moriarity, Branden S. (2018): EditR: A Method to Quantify Base Editing from Sanger Sequencing. In: *The CRISPR journal* 1, S. 239–250. DOI: 10.1089/crispr.2018.0014.
- Knudson, A. G. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (4), S. 820–823. DOI: 10.1073/pnas.68.4.820.
- Koga, Takaomi; Hashimoto, Shuichi; Sugio, Kenji; Yoshino, Ichiro; Nakagawa, Kazunori; Yonemitsu, Yoshikazu et al. (2001): Heterogeneous distribution of P53 immunoreactivity in human lung adenocarcinoma correlates with MDM2 protein expression, rather than with P53 gene mutation. In: *Int. J. Cancer* 95 (4), S. 232–239. DOI: 10.1002/1097-0215(20010720)95:4<232::AID-IJC1040>3.0.CO;2-5.
- Komor, Alexis C.; Kim, Yongjoo B.; Packer, Michael S.; Zuris, John A.; Liu, David R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. In: *Nature* 533 (7603), S. 420–424. DOI: 10.1038/nature17946.
- Kotler, Eran; Shani, Odem; Goldfeld, Guy; Lotan-Pompan, Maya; Tarcic, Ohad; Gershoni, Anat et al. (2018): A Systematic p53 Mutation Library Links Differential Functional Impact to Cancer Mutation Pattern and Evolutionary Conservation. In: *Molecular Cell* 71 (1), 178-190.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.06.012.
- Kouno, Takahide; Silvas, Tania V.; Hilbert, Brendan J.; Shandilya, Shivender M. D.; Bohn, Markus F.; Kelch, Brian A. et al. (2017): Crystal structure of APOBEC3A bound to single-stranded DNA reveals structural basis for cytidine deamination and specificity. In: *Nature communications* 8, S. 15024. DOI: 10.1038/ncomms15024.
- Kruse, Jan-Philipp; Gu, Wei (2009): Modes of p53 regulation. In: *Cell* 137 (4), S. 609–622. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.050.
- Kubbutat, M. H.; Jones, S. N.; Vousden, K. H. (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2. In: *Nature* 387 (6630), S. 299–303. DOI: 10.1038/387299a0.

- Kurosaki, Tatsuaki; Maquat, Lynne E. (2016): Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. In: *Journal of cell science* 129 (3), S. 461–467. DOI: 10.1242/jcs.181008.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lang, Gene A.; Iwakuma, Tomoo; Suh, Young-Ah; Liu, Geng; Rao, V. Ashutosh; Parant, John M. et al. (2004): Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. In: *Cell* 119 (6), S. 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.006.
- Le Cong; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF) (2018): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. AWMF-Registernummer: 020/007OL. Unter Mitarbeit von Deutsche Krebshilfe Deutsche Krebsgesellschaft. Langversion 1.0. Online verfügbar unter <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Lungenkarzinom.98.0.html>, zuletzt geprüft am 10.04.2021.
- Li, Dun; Marchenko, Natalia D.; Schulz, Ramona; Fischer, Victoria; Velasco-Hernandez, Talia; Talos, Flaminia; Moll, Ute M. (2011): Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells. In: *Molecular cancer research : MCR* 9 (5), S. 577–588. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0534.
- Li, Xuan; Heyer, Wolf-Dietrich (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. In: *Cell research* 18 (1), S. 99–113. DOI: 10.1038/cr.2008.1.
- Lieber, Michael R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
- Ling, Xinyu; Xie, Bingteng; Gao, Xiaoqin; Chang, Liying; Zheng, Wei; Chen, Heqi et al. (2020): Improving the efficiency of precise genome editing with site-specific Cas9-oligonucleotide conjugates. In: *Science advances* 6 (15), eaaz0051. DOI: 10.1126/sciadv.aaz0051.
- Liu, Yanqing; Taviana, Omid; Gu, Wei (2019): p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. In: *Journal of molecular cell biology* 11 (7), S. 564–577. DOI: 10.1093/jmcb/mjz060.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lodish, Harvey F.; Berk, Arnold; Kaiser, Chris; Krieger, Monty; Bretscher, Anthony; Ploegh, Hidde L. et al. (2013): *Molecular cell biology*. Seventh edition, International edition. New York: W.H. Freeman and Company.

- Logue, Eric C.; Bloch, Nicolin; Dhuey, Erica; Zhang, Ruonan; Cao, Ping; Herate, Cecile et al. (2014): A DNA sequence recognition loop on APOBEC3A controls substrate specificity. In: *PloS one* 9 (5), e97062. DOI: 10.1371/journal.pone.0097062.
- Ludwig, R. L.; Bates, S.; Vousden, K. H. (1996): Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. In: *Molecular and cellular biology* 16 (9), S. 4952–4960. DOI: 10.1128/mcb.16.9.4952.
- Ma, Ming; Zhuang, Fengfeng; Hu, Xiongbing; Wang, Bolun; Wen, Xian-Zi; Ji, Jia-Fu; Xi, Jianzhong Jeff (2017): Efficient generation of mice carrying homozygous double-floxp alleles using the Cas9-Avidin/Biotin-donor DNA system. In: *Cell research* 27 (4), S. 578–581. DOI: 10.1038/cr.2017.29.
- Mahmood, Tahrin; Yang, Ping-Chang (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. In: *North American journal of medical sciences* 4 (9), S. 429–434. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.
- Mali, Prashant; Yang, Luhan; Esvelt, Kevin M.; Aach, John; Guell, Marc; DiCarlo, James E. et al. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 823–826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- Malkin, D.; Li, F. P.; Strong, L. C.; Fraumeni, J. F.; Nelson, C. E.; Kim, D. H. et al. (1990): Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. In: *Science (New York, N.Y.)* 250 (4985), S. 1233–1238. DOI: 10.1126/science.1978757.
- Manser, Renée; Lethaby, Anne; Irving, Louis B.; Stone, Christine; Byrnes, Graham; Abramson, Michael J.; Campbell, Don (2013): Screening for lung cancer. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (6), CD001991. DOI: 10.1002/14651858.CD001991.pub3.
- Maruyama, Takeshi; Dougan, Stephanie K.; Truttmann, Matthias C.; Bilate, Angelina M.; Ingram, Jessica R.; Ploegh, Hidde L. (2015): Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. In: *Nature biotechnology* 33 (5), S. 538–542. DOI: 10.1038/nbt.3190.
- McCord, Per H. (2016): Using droplet digital PCR (ddPCR) to detect copy number variation in sugarcane, a high-level polyploid. In: *Euphytica* 209 (2), S. 439–448. DOI: 10.1007/s10681-016-1657-7.
- McVey, Mitch; Lee, Sang Eun (2008): MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. In: *Trends in genetics : TIG* 24 (11), S. 529–538. DOI: 10.1016/j.tig.2008.08.007.
- Meek, David W.; Anderson, Carl W. (2009): Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (6), a000950. DOI: 10.1101/cshperspect.a000950.
- Modrow, Susanne; Truyen, Uwe; Schätzl, Hermann (2021): *Molekulare Virologie*. 4th ed. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Springer Spektrum.
- Mojica, F. J. M.; Díez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J.; Almendros, C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. In:

Microbiology (Reading, England) 155 (Pt 3), S. 733–740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.

Morris, Luc G. T.; Chan, Timothy A. (2015): Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. In: *Cancer* 121 (9), S. 1357–1368. DOI: 10.1002/cncr.29140.

Muller, Patricia A. J.; Vousden, Karen H. (2014): Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. In: *Cancer cell* 25 (3), S. 304–317. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.01.021.

Nabel, Christopher S.; Jia, Huijue; Ye, Yu; Shen, Li; Goldschmidt, Hana L.; Stivers, James T. et al. (2012): AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. In: *Nature chemical biology* 8 (9), S. 751–758. DOI: 10.1038/nchembio.1042.

Nakano, Katsunori; Vousden, Karen H. (2001): PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. In: *Molecular Cell* 7 (3), S. 683–694. DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00214-3.

Nichols, Caitlin A.; Gibson, William J.; Brown, Meredith S.; Kosmicki, Jack A.; Busanovich, John P.; Wei, Hope et al. (2020): Loss of heterozygosity of essential genes represents a widespread class of potential cancer vulnerabilities. In: *Nature communications* 11 (1), S. 2517. DOI: 10.1038/s41467-020-16399-y.

Nishida, Keiji; Arazoe, Takayuki; Yachie, Nozomu; Banno, Satomi; Kakimoto, Mika; Tabata, Mayura et al. (2016): Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 353 (6305). DOI: 10.1126/science.aaf8729.

O'Brien, Stephen G.; Guilhot, François; Larson, Richard A.; Gathmann, Insa; Baccarani, Michele; Cervantes, Francisco et al. (2003): Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. In: *The New England journal of medicine* 348 (11), S. 994–1004. DOI: 10.1056/NEJMoa022457.

Olotu, Fisayo A.; Soliman, Mahmoud E. S. (2019): Dynamic perspectives into the mechanisms of mutation-induced p53-DNA binding loss and inactivation using active perturbation theory: Structural and molecular insights toward the design of potent reactivators in cancer therapy. In: *Journal of cellular biochemistry* 120 (1), S. 951–966. DOI: 10.1002/jcb.27458.

Perez-Pinera, Pablo; Kocak, D. Dewran; Vockley, Christopher M.; Adler, Andrew F.; Kabadi, Ami M.; Polstein, Lauren R. et al. (2013): RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. In: *Nature methods* 10 (10), S. 973–976. DOI: 10.1038/nmeth.2600.

Pignon, J. P.; Tribodet, H.; Scagliotti, G. V.; Douillard, J. Y.; Shepherd, F. A.; Stephens, R. J.; Le Chevalier, T. (2006): Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation (LACE): A pooled analysis of five randomized clinical trials including 4,584 patients. In: *JCO* 24 (18_suppl), S. 7008. DOI: 10.1200/jco.2006.24.18_suppl.7008.

Pomerantz, Jason; Schreiber-Agus, Nicole; Liégeois, Nanette J.; Silverman, Adam; Alland, Leila; Chin, Lynda et al. (1998): The Ink4a Tumor Suppressor Gene Product,

- p19Arf, Interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibition of p53. In: *Cell* 92 (6), S. 713–723. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81400-2.
- Porto, Elizabeth M.; Komor, Alexis C.; Slaymaker, Ian M.; Yeo, Gene W. (2020): Base editing: advances and therapeutic opportunities. In: *Nature reviews. Drug discovery* 19 (12), S. 839–859. DOI: 10.1038/s41573-020-0084-6.
- Potter, Huntington (2003): Transfection by electroporation. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 9, Unit 9.3. DOI: 10.1002/0471142727.mb0903s62.
- Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch* (2020). 268. Aufl. Boston: De Gruyter.
- Qi, Lei S.; Larson, Matthew H.; Gilbert, Luke A.; Doudna, Jennifer A.; Weissman, Jonathan S.; Arkin, Adam P.; Lim, Wendell A. (2013): Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. In: *Cell* 152 (5), S. 1173–1183. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
- Rassow, Joachim; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer (2016): *Biochemie*. 855 Abbildungen. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Rees, Holly A.; Liu, David R. (2018): Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. In: *Nature reviews. Genetics* 19 (12), S. 770–788. DOI: 10.1038/s41576-018-0059-1.
- Reetz, Manfred T.; Carballeira, José Daniel (2007): Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. In: *Nature protocols* 2 (4), S. 891–903. DOI: 10.1038/nprot.2007.72.
- Resnick, Michael A.; Inga, Alberto (2003): Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (17), S. 9934–9939. DOI: 10.1073/pnas.1633803100.
- Robert-Koch-Institut (2016): Zentrum für Krebsregisterdaten. Online verfügbar unter www.krebsdaten.de, zuletzt geprüft am 10.04.2021.
- Robert-Koch-Institut; Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019): Krebs in Deutschland 2015/2016. Unter Mitarbeit von Koch-Institut, Robert, zuletzt geprüft am 30.04.2021.
- Robertson, Keith D. (2005): DNA methylation and human disease. In: *Nature reviews. Genetics* 6 (8), S. 597–610. DOI: 10.1038/nrg1655.
- Ryan, M. D.; King, A. M.; Thomas, G. P. (1991): Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. In: *The Journal of general virology* 72 (Pt 11), S. 2727–2732. DOI: 10.1099/0022-1317-72-11-2727.
- Sakuma, Tetsushi; Nakade, Shota; Sakane, Yuto; Suzuki, Ken-Ichi T.; Yamamoto, Takashi (2016): MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. In: *Nature protocols* 11 (1), S. 118–133. DOI: 10.1038/nprot.2015.140.
- Sallman, David A. (2020): To target the untargetable: elucidation of synergy of APR-246 and azacitidine in TP53 mutant myelodysplastic syndromes and acute myeloid

- leukemia. In: *Haematologica* 105 (6), S. 1470–1472. DOI: 10.3324/haematol.2020.249060.
- Sander, Jeffry D.; Joung, J. Keith (2014): CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. In: *Nature biotechnology* 32 (4), S. 347–355. DOI: 10.1038/nbt.2842.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sauer, B.; Henderson, N. (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (14), S. 5166–5170. DOI: 10.1073/pnas.85.14.5166.
- Savitsky, K.; Bar-Shira, A.; Gilad, S.; Rotman, G.; Ziv, Y.; Vanagaite, L. et al. (1995): A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5218), S. 1749–1753. DOI: 10.1126/science.7792600.
- Schübeler, Dirk (2015): Function and information content of DNA methylation. In: *Nature* 517 (7534), S. 321–326. DOI: 10.1038/nature14192.
- Schulz-Heddergott, Ramona; Moll, Ute M. (2018): Gain-of-Function (GOF) Mutant p53 as Actionable Therapeutic Target. In: *Cancers* 10 (6). DOI: 10.3390/cancers10060188.
- Shaw, Alice T.; Kim, Dong-Wan; Nakagawa, Kazuhiko; Seto, Takashi; Crinó, Lucio; Ahn, Myung-Ju et al. (2013): Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. In: *The New England journal of medicine* 368 (25), S. 2385–2394. DOI: 10.1056/NEJMoa1214886.
- Shen, Bin; Zhang, Wensheng; Zhang, Jun; Zhou, Jiankui; Wang, Jianying; Chen, Li et al. (2014): Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. In: *Nature methods* 11 (4), S. 399–402. DOI: 10.1038/nmeth.2857.
- Sherr, Charles J. (2004): Principles of Tumor Suppression. In: *Cell* 116 (2), S. 235–246. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)01075-4.
- Shi, Ke; Carpenter, Michael A.; Banerjee, Surajit; Shaban, Nadine M.; Kurahashi, Kayo; Salamango, Daniel J. et al. (2017): Structural basis for targeted DNA cytosine deamination and mutagenesis by APOBEC3A and APOBEC3B. In: *Nature structural & molecular biology* 24 (2), S. 131–139. DOI: 10.1038/nsmb.3344.
- Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A. et al. (2001): Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. In: *The New England journal of medicine* 344 (11), S. 783–792. DOI: 10.1056/NEJM200103153441101.
- Solomon, Benjamin J.; Mok, Tony; Kim, Dong-Wan; Wu, Yi-Long; Nakagawa, Kazuhiko; Mekhail, Tarek et al. (2014): First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. In: *The New England journal of medicine* 371 (23), S. 2167–2177. DOI: 10.1056/NEJMoa1408440.

- Song, Jun; Yang, Dongshan; Xu, Jie; Zhu, Tianqing; Chen, Y. Eugene; Zhang, Jifeng (2016): RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. In: *Nature communications* 7, S. 10548. DOI: 10.1038/ncomms10548.
- Soussi, T.; Wiman, K. G. (2015): TP53: an oncogene in disguise. In: *Cell death and differentiation* 22 (8), S. 1239–1249. DOI: 10.1038/cdd.2015.53.
- Spell, Rachele Miller; Jinks-Robertson, Sue (2003): Role of mismatch repair in the fidelity of RAD51- and RAD59-dependent recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Genetics* 165 (4), S. 1733–1744. DOI: 10.1093/genetics/165.4.1733.
- Spies, Maria; Fishel, Richard (2015): Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (3), a022657. DOI: 10.1101/cshperspect.a022657.
- Statistisches Bundesamt (Destatis) (2020): Todesursachenstatistik Deutschland 2019. Online verfügbar unter <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=1&step=1&titel=Erg%20ergebnis&levelid=1618049582382&acceptcookies=false#abreadcrumb>, zuletzt geprüft am 29.04.2021.
- Stiewe, Thorsten; Haran, Tali E. (2018): How mutations shape p53 interactions with the genome to promote tumorigenesis and drug resistance. In: *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 38, S. 27–43. DOI: 10.1016/j.drug.2018.05.001.
- Sun, Hong; Yu, Guangjun (2019): New insights into the pathogenicity of non-synonymous variants through multi-level analysis. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 1667. DOI: 10.1038/s41598-018-38189-9.
- Suzuki, Miho M.; Bird, Adrian (2008): DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. In: *Nature reviews. Genetics* 9 (6), S. 465–476. DOI: 10.1038/nrg2341.
- Sykes, P. J.; Neoh, S. H.; Brisco, M. J.; Hughes, E.; Condon, J.; Morley, A. A. (1992): Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. In: *BioTechniques* 13 (3), S. 444–449.
- Symington, Lorraine S.; Gautier, Jean (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. In: *Annual review of genetics* 45, S. 247–271. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.
- Synthego (2019): Synthego Performance Analysis, ICE Analysis. CRISPR Performance Analysis Tool. Version v2.0. Online verfügbar unter <https://ice.synthego.com/#/>, zuletzt geprüft am 26.03.2021.
- Takahashi, T.; Nau, M. M.; Chiba, I.; Birrer, M. J.; Rosenberg, R. K.; Vinocour, M. et al. (1989): p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. In: *Science (New York, N.Y.)* 246 (4929), S. 491–494. DOI: 10.1126/science.2554494.
- Tan, Junjie; Zhang, Fei; Karcher, Daniel; Bock, Ralph (2019): Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. In: *Nature communications* 10 (1), S. 439. DOI: 10.1038/s41467-018-08034-8.

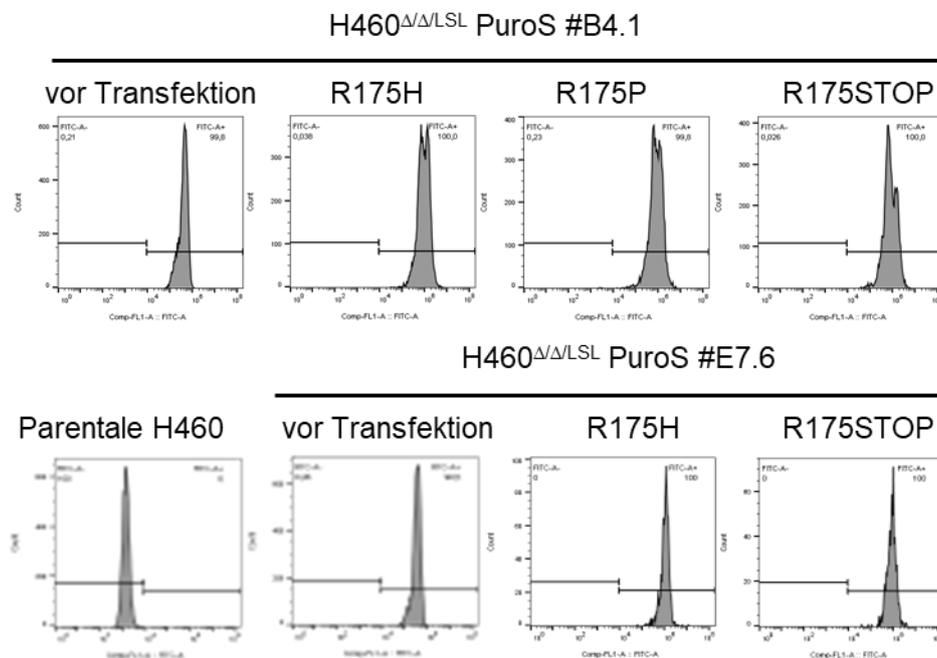
- Tan, Junjie; Zhang, Fei; Karcher, Daniel; Bock, Ralph (2020): Expanding the genome-targeting scope and the site selectivity of high-precision base editors. In: *Nature communications* 11 (1), S. 629. DOI: 10.1038/s41467-020-14465-z.
- Tang, Yi; Zhao, Wenhui; Chen, Yue; Zhao, Yingming; Gu, Wei (2008): Acetylation is indispensable for p53 activation. In: *Cell* 133 (4), S. 612–626. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.025.
- Tate, John G.; Bamford, Sally; Jubb, Harry C.; Sondka, Zbyslaw; Beare, David M.; Bindal, Nidhi et al. (2019): COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D941-D947. DOI: 10.1093/nar/gky1015.
- TCGA Research Network: The Cancer Genome Atlas: NIH National Cancer Institute. Online verfügbar unter <https://www.cancer.gov/tcga>, zuletzt geprüft am 02.05.2021.
- Teng, B.; Burant, C. F.; Davidson, N. O. (1993): Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 260 (5115), S. 1816–1819. DOI: 10.1126/science.8511591.
- Terzian, Tamara; Suh, Young-Ah; Iwakuma, Tomoo; Post, Sean M.; Neumann, Manja; Lang, Gene A. et al. (2008): The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. In: *Genes & development* 22 (10), S. 1337–1344. DOI: 10.1101/gad.1662908.
- Thomas, M.; White, R. L.; Davis, R. W. (1976): Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (7), S. 2294–2298. DOI: 10.1073/pnas.73.7.2294.
- Timofeev, Oleg; Schlereth, Katharina; Wanzel, Michael; Braun, Attila; Nieswandt, Bernhard; Pagenstecher, Axel et al. (2013): p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo. In: *Cell reports* 3 (5), S. 1512–1525. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.04.008.
- Toshiyuki, Miyashita; Reed, John C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. In: *Cell* 80 (2), S. 293–299. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90412-3.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Vara, Jesús; Malpartida, Francisco; Hopwood, David A.; Jiménez, Antonio (1985): Cloning and expression of a puromycin N-acetyl transferase gene from *Streptomyces alboniger* in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. In: *Gene* 33 (2), S. 197–206. DOI: 10.1016/0378-1119(85)90094-0.
- Vardimon, L.; Kressmann, A.; Cedar, H.; Maechler, M.; Doerfler, W. (1982): Expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (4), S. 1073–1077. DOI: 10.1073/pnas.79.4.1073.

- Vassilev, Lyubomir T.; Vu, Binh T.; Graves, Bradford; Carvajal, Daisy; Podlaski, Frank; Filipovic, Zoran et al. (2004): In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. In: *Science (New York, N.Y.)* 303 (5659), S. 844–848. DOI: 10.1126/science.1092472.
- Ventura, Andrea; Kirsch, David G.; McLaughlin, Margaret E.; Tuveson, David A.; Grimm, Jan; Lintault, Laura et al. (2007): Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. In: *Nature* 445 (7128), S. 661–665. DOI: 10.1038/nature05541.
- Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. (2000): Surfing the p53 network. In: *Nature* 408 (6810), S. 307–310. DOI: 10.1038/35042675.
- Vousden, Karen H.; Prives, Carol (2009): Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. In: *Cell* 137 (3), S. 413–431. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.
- Walton, Russell T.; Christie, Kathleen A.; Whittaker, Madelynn N.; Kleinstiver, Benjamin P. (2020): Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. In: *Science (New York, N.Y.)* 368 (6488), S. 290–296. DOI: 10.1126/science.aba8853.
- Wang, Haoyi; Yang, Hui; Shivalila, Chikdu S.; Dawlaty, Meelad M.; Cheng, Albert W.; Zhang, Feng; Jaenisch, Rudolf (2013): One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. In: *Cell* 153 (4), S. 910–918. DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.025.
- Wang, Xiao; Li, Jianan; Wang, Ying; Yang, Bei; Wei, Jia; Wu, Jing et al. (2018): Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion. In: *Nature biotechnology* 36 (10), S. 946–949. DOI: 10.1038/nbt.4198.
- Wang, Xiaoling; Wang, Yebo; Wu, Xiwei; Wang, Jinhui; Wang, Yingjia; Qiu, Zhaojun et al. (2015): Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. In: *Nat Biotechnol* 33 (2), S. 175–178. DOI: 10.1038/nbt.3127.
- Wang, Xuan J.; L, Jeffrey Medeiros; Bueso-Ramos, Carlos E.; Tang, Guilin; Wang, Sa; Oki, Yasuhiro et al. (2017): P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 30 (2), S. 194–203. DOI: 10.1038/modpathol.2016.178.
- Wang, Ying; Gao, Runze; Wu, Jing; Xiong, Yi-Chun; Wei, Jia; Zhang, Sipin et al. (2019): Comparison of cytosine base editors and development of the BEable-GPS database for targeting pathogenic SNVs. In: *Genome biology* 20 (1), S. 218. DOI: 10.1186/s13059-019-1839-4.
- Weinberg, Robert A. (2014): The biology of cancer. Second edition. New York, NY: Garland Science.
- Will, Cindy L.; Lührmann, Reinhard (2011): Spliceosome Structure and Function. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (7). DOI: 10.1101/cshperspect.a003707.
- Willis, Amy; Jung, Eun Joo; Wakefield, Therese; Chen, Xinbin (2004): Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the

- promoter of its target genes. In: *Oncogene* 23 (13), S. 2330–2338. DOI: 10.1038/sj.onc.1207396.
- Wilson, J. H.; Berget, P. B.; Pipas, J. M. (1982): Somatic cells efficiently join unrelated DNA segments end-to-end. In: *Molecular and cellular biology* 2 (10), S. 1258–1269.
- Wu, Yi-Long; Zhou, Caicun; Hu, Cheng-Ping; Feng, Jifeng; Lu, Shun; Huang, Yunchao et al. (2014): Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 15 (2), S. 213–222. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70604-1.
- Yue, Xuetian; Zhao, Yuhuan; Xu, Yang; Zheng, Min; Feng, Zhaohui; Hu, Wenwei (2017): Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. In: *Journal of molecular biology* 429 (11), S. 1595–1606. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.030.
- Zentrum Für Krebsregisterdaten (ZfKD) Im Robert Koch-Institut (2020): Datensatz des ZfKD auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten Epi2019_2, verfügbare Diagnosejahre bis 2017 (für die neuen Bundesländer nur bis Diagnosejahr 2016). Unter Mitarbeit von Klaus Kraywinkel und André Kötschau, zuletzt geprüft am 29.04.2021.
- Zhang, Cen; Liu, Juan; Xu, Dandan; Zhang, Tianliang; Hu, Wenwei; Feng, Zhaohui (2020): Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy. In: *Journal of molecular cell biology* 12 (9), S. 674–687. DOI: 10.1093/jmcb/mjaa040.
- Zhang, Xiao-Hui; Tee, Louis Y.; Wang, Xiao-Gang; Huang, Qun-Shan; Yang, Shi-Hua (2015): Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 4, e264. DOI: 10.1038/mtna.2015.37.
- Zhu, Gaoyang; Pan, Chaoyun; Bei, Jin-Xin; Li, Bo; Liang, Chen; Xu, Yang; Fu, Xuemei (2020): Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 595187. DOI: 10.3389/fonc.2020.595187.

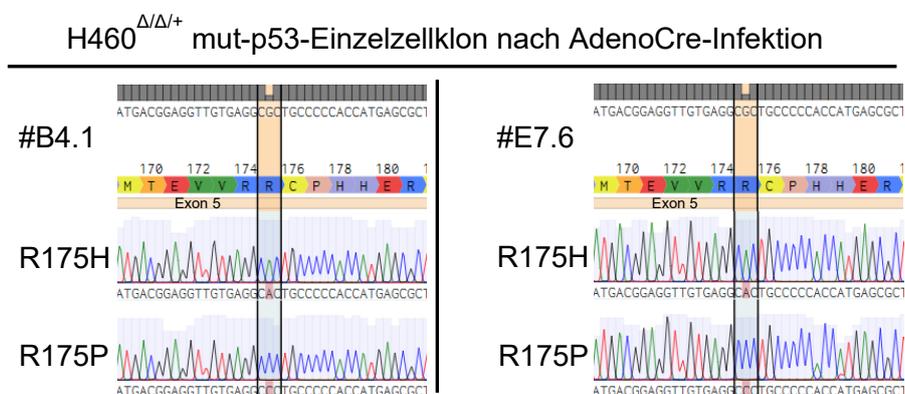
8. Anhang

Supplementäre Abbildungen



Suppl. Abbildung I: Durchflusszytometrie der jeweiligen Einzelzellklone vor Transfektion und nach Transfektion mit dem jeweiligen Mutationstragenden Vektor.

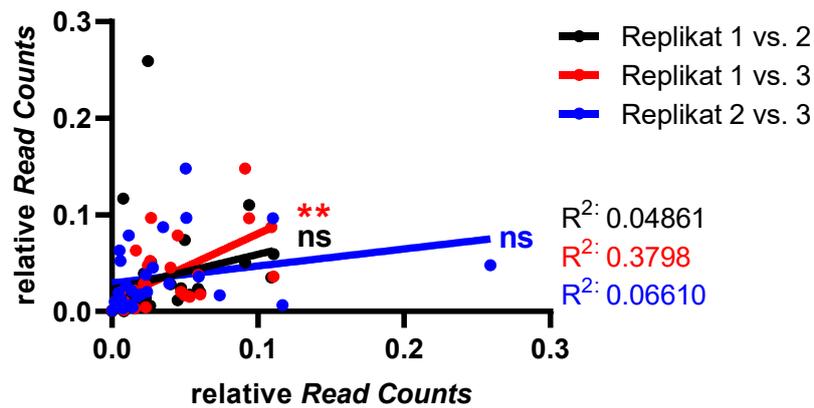
Filterung durch den FITC-Kanal. FITC-Positivität korreliert mit Expression von GFP.



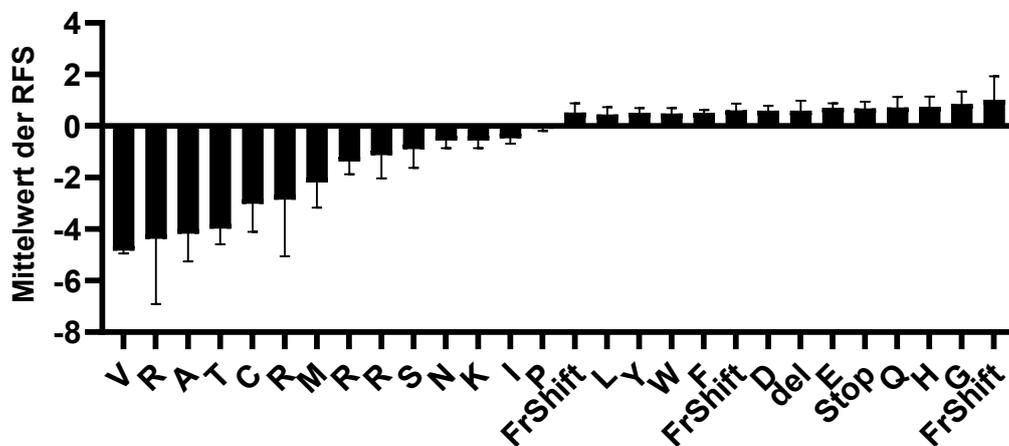
Suppl. Abbildung II: Sanger-Sequenzierung von cDNA der Einzelzellklone nach AdenoCre-Infektion.

Bei Analyse von je 3 Einzelzellklonen zeigten sich für #B4.1 R175H und R175P, sowie #E7.6 R175H 1/3 EZK mutiert. Bei #E7.6 R175P exprimierten 3/3 EZK die Mutante.

A



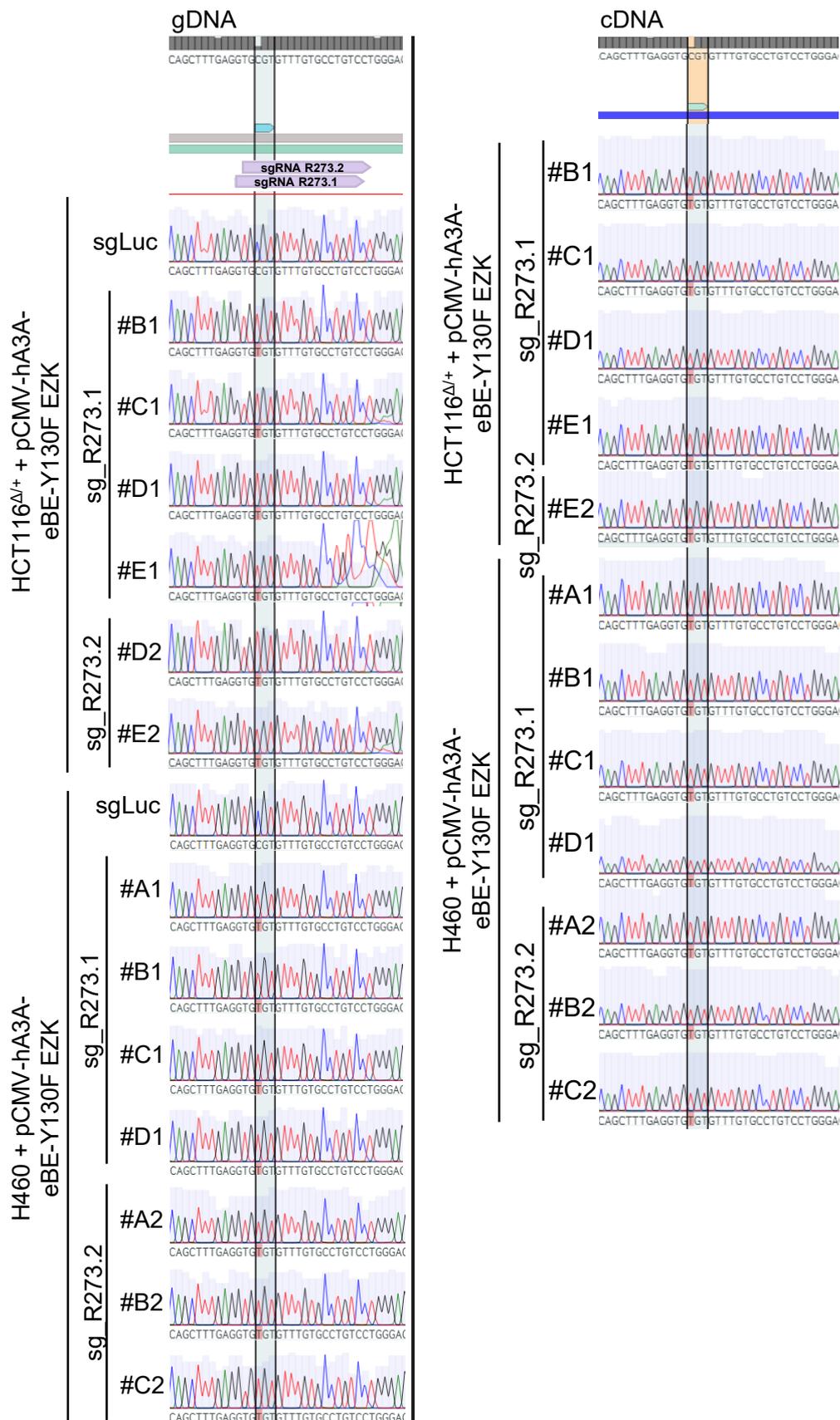
B



Suppl. Abbildung III: NGS-Auswertung der R175-Library.

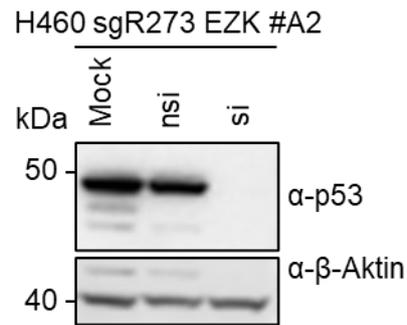
A: Darstellung der relativen *Read Counts* aller Datenpunkte der drei Replikate nach AdenoCre-Infektion und DMSO-Behandlung in einem zweidimensionalen Streudiagramm mit linearer Regressionslinie. R^2 entspricht der automatisch errechneten Pearson-Korrelation. Angabe einer signifikanten Korrelation: ** entspricht $p < 0.005$; ns entspricht nicht signifikant.

B: Mittelwerte der RFS aus den drei Replikaten, in aufsteigender Reihenfolge sortiert mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung.



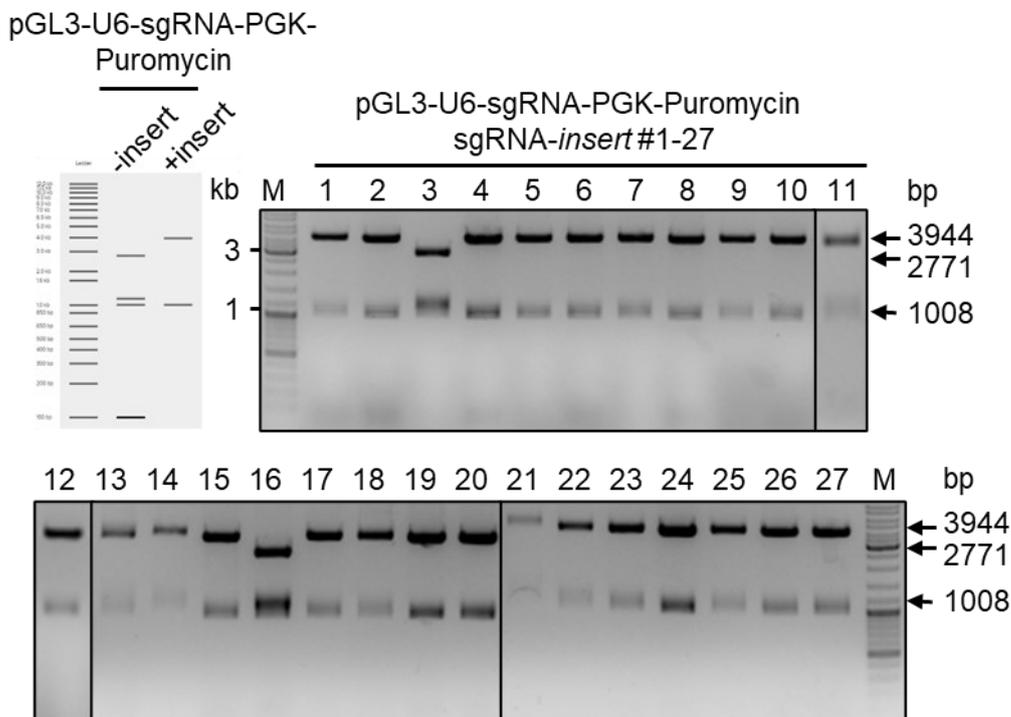
Suppl. Abbildung IV: Nachweis der R273C-Mutation in allen Einzelzellklonen.

Sanger-Sequenzierung von generierter gDNA (**links**) bzw. cDNA (**rechts**) aus H460- bzw. HCT116^{Δ/+} -- Einzelzellklonen nach Base Editor-Transfektion. Hervorhebung des R273-Codons in Exon 8 von TP53.



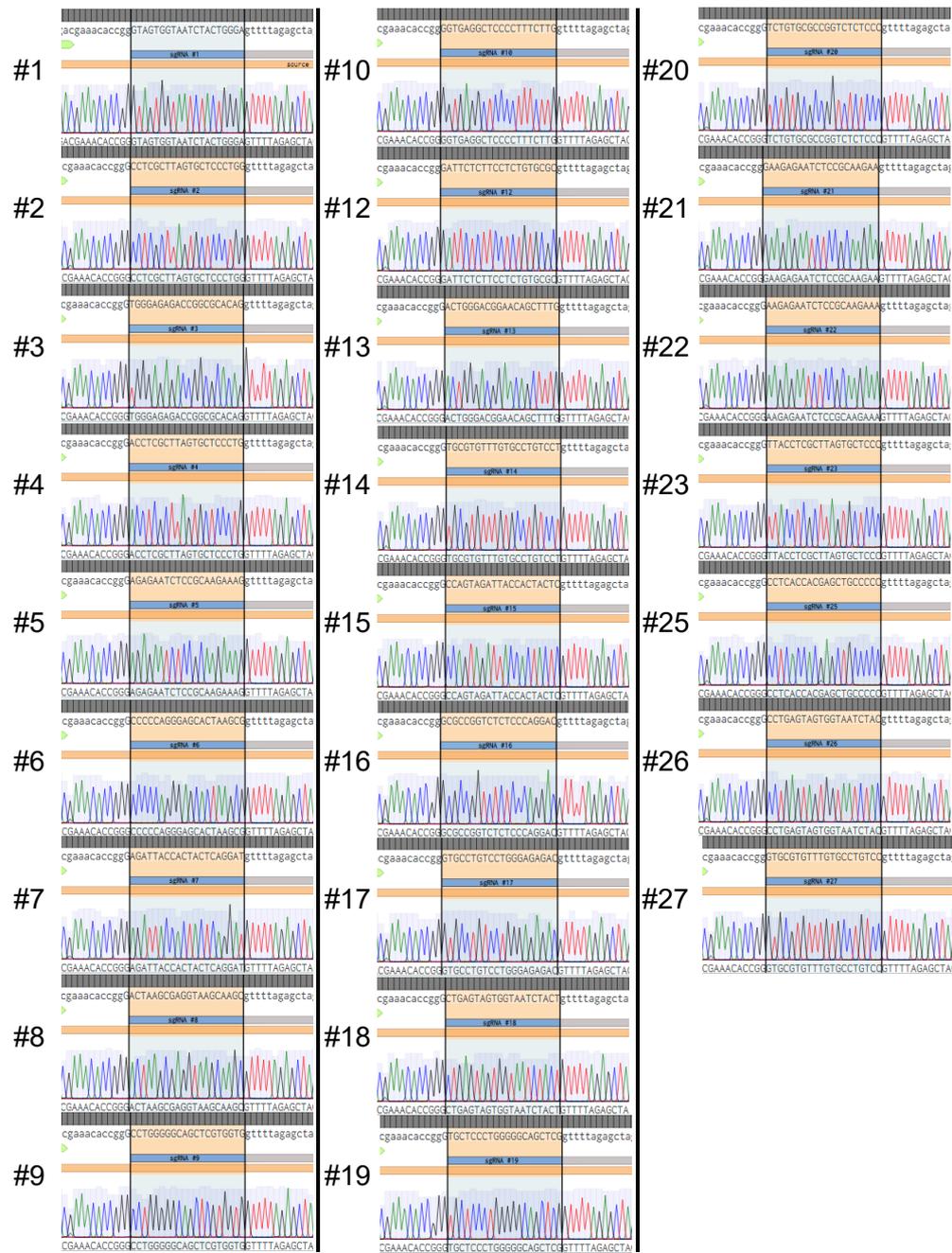
Suppl. Abbildung V: siRNA-Knockdown von H460 R273C-Einzelzellklon

Western Blot eines exemplarischen H460 R273C-EZKs nach 3-tägiger 20 μ M p53 siRNA- bzw. nsiRNA-Inkubation und einer unbehandelten Kontrolle (Mock).



Suppl. Abbildung VI: Validierung der Klonierung von pGL3_U6_sgRNA_PGK_puromycin_1-27 durch Restriktionsverdau.

Restriktionsverdau der generierten Minis nach GoldenGate-Klonierung mit BsaI und BspHI für 2 h. Bei erfolgreichem Einbau der sgRNA-Sequenz waren keine BsaI-Schnittstellen mehr vorhanden, sodass die Größe der Restriktionsfragmente 1008 bp und 3944 bp war. Bei keinem erfolgreichen Einbau wären die BsaI-Schnittstellen noch vorhanden, sodass die Restriktionsfragmente eine Größe von 25 bp, 1008 bp, 1148 bp und 2771 bp gehabt hätten. sgRNAs #3 und #16, die in ihrer Sequenz eine BsaI-Schnittstelle trugen, waren sie beim Restriktionsverdau negativ. Auch #20 trug eine BsaI-Schnittstelle, hatte jedoch eine zufällige 1 bp Deletion, sodass sie in diesem Kontrollverdau negativ erschien und wiederholt wurde.



Suppl. Abbildung VII: Validierung der Klonierung von pGL3_U6_sgRNA_PGK_puromycin_1-27 durch Sequenzierung.

Sanger-Sequenzierung der generierten Minis aus der GoldenGate-Klonierung nach Purifikation dieser durch das QIAamp PCR Purification Kit (QIAGEN N.V.).

Lebenslauf

- entfernt -

Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt:

Adamkiewicz, Adhikary, Baranovski, Bauer, Bette, Bertoune, Bonaterra, Bogdan, Braun, Brehm, Cetin, Daut, Decher, del Rey, Feuser, Grundmann, Halaszovich, Hildebrandt, Jacob, Kinscherf, Kiper, Krämer, Lill, Mey, Meißner, Milani, Müller, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Quint, Reese, Renigunta, Rinné, Rost, Rust, Sahmland, Schütz, Schwarz, Schratt, Schwarzbach, Seitz, Stahl, Steiniger, Stiewe, Suske, Thieme, Timofeev, von Zezschwitz, Wanzel, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wilhelmi, Wrocklage.

Klinischer Studienabschnitt:

Ahrens, Aigner, Arndt, Aust, Bartsch, Bauer, Becker, Bein, Bender, Betz, Birk, Bliemel, Bösner, Brandt, Burchert, Bürfent, Czubayko, De Cruppé, Denkert, Denzer, Dettmeyer, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhardt, Eberle, Engenhardt-Cabillic, Eubel, Eschbach, Faoro, Feldmann, Figiel, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geis, Geisthoff, Geks, Geraedts, Geßner, Görg, Grgic, Gress, Grote, Gschnell, Günther, Haas, Haberhausen, Hertl, Hoch, Hoffmann, Hofmann, Holzer, Hoyer, Hundt, Jansen, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kamp-Becker, Kann, Kanngießner, Karl, Keil, Keller, Kernbach-Wighton, Kerwat, Kill, Kircher, Kirschbaum, Klapsing, Klemmer, Knake, Koehler, Kolb-Niemann, Kömhoff, Kortus-Götze, Kruse, Kühnert, Kussin, Leonhardt, Lohoff, Lüsebrink, Luster, Mahnken, Maier, Maisner, Mand, Mandic, Mann, Markus, Maurer, Mirow, Moll, Müller, Neff, Nenadic, Neubauer, Nikolaizik, Nimsky, Opitz, Pagenstecher, Paul, Pfützner, Plant, Portig, Ramaswamy, Rastan, Rattay, Renke, Renz, Riera-Knorrenschild, Richter, Roelcke, Roeßler, Ruchholtz, Rüscher, Schäfer, Schieffer, Schmidt, Schnare, Schneider, Schötz, Schulze, Schu, Schumacher, Schymalla, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Skevaki, Sommer, Streubel, Stuck, Swaid, Tackenberg, Timmermann, Vahdad, Verburg, Vogelmeier, Vogt, Völlger, Vorwerk, Wächter, Wagner, Weber, Wiese, Worzfeld, Wulf, Wündisch, Wiesmann, Ziller, Zovko, Zwiorek.

Meine akademischen Lehrenden waren in Fulda:

Isselstein, Repp, Sasaki, Weber.

Danksagung

Zuallererst möchte ich ganz besonders meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thorsten Stiewe danken für die Möglichkeit, mit dieser spannenden Projektarbeit zu seiner Forschung beitragen zu dürfen. Vielen Dank für die ausgezeichnete und wohlwollende Betreuung während meiner Zeit im Labor. Ich bin äußerst dankbar für die wertvollen Ratschlägen bei jeglicher Art von Problemen.

Außerdem bin ich Frau Julianne Funk, M.Sc. zutiefst dankbar, dass sie sich täglich viel Zeit genommen hat, mich in molekularbiologische Methoden einzuführen, mit mir Experimente zu planen und ihre gesammelte Expertise an mich weiterzugeben. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und für deine geduldige Unterstützung!

Big Thanks to all other members of the AG Stiewe and the Core Facility for your support and your kindness throughout my time. Thank you for your advice and for creating such a pleasant working atmosphere! Thanks to Aaron, Aleksandra, Andrea, Antje, Björn, Geli, Katharina, Luisa, Maria, Michael, Miri, Oleg, Phillip, Pier, Sabrina, Siggie and Tabea. An especial thanks to Amir for your great help on migration assays.

Liebe:r Julia, Katharina, Marius, Michelle, Nasti, Patrizia und Saman, vielen Dank für die unterhaltsamen und aufbauenden Kaffeepausen. Ich könnte mir rückblickend meine Zeit im Labor gar nicht mehr vorstellen ohne unsere Konversationen über Gott und die Welt. Die Freundschaft zu euch hat diese Zeit zu einer so wertvollen Episode meines Lebens gemacht, an die ich gerne zurückdenke.

Zum Schluss möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken. Vielen Dank für eure bedingungslose Unterstützung meines gesamten Studiums, wie auch meiner Forschungssemester. Danke, dass ich alle meine Träume und Vorhaben umsetzen konnte und kann. Ohne euch wäre das alles nicht ansatzweise möglich gewesen.

Ehrenwörtliche Erklärung

- entfernt -